

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***DNAJC9* GENİNİN MEME KANSERİNDEKİ İFADESİ,
GENETİK/ EPİGENETİK ALTERASYONLARI VE PROGNOSTİK DEĞERİ**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OYA İNCEKARA

HAZİRAN 2022

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***DNAJC9* GENİNİN MEME KANSERİNDEKİ İFADESİ,
GENETİK/ EPIGENETİK ALTERASYONLARI VE PROGNOSTİK DEĞERİ**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oya İNCEKARA

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Tolga ACUN

ZONGULDAK

Haziran 2022

KABUL:

Oya İNCEKARA tarafından hazırlanan “*DNAJC9* geninin meme kanserindeki ifadesi genetik/ epigenetik alterasyonları ve prognostik değeri” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle/oyçokluğuyla kabul edilmiştir. 24/06/2022

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tolga ACUN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler
Biyoloji ve Genetik Bölümü

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM

Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
Bölümü

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Kerem Mert ŞENSES

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler
Biyoloji ve Genetik Bölümü

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım./...../2022

Prof. Dr. Ahmet ÖZARSLAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Oya İNCEKARA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***DNAJC9* GENİNİN MEME KANSERİNDEKİ İFADESİ, GENETİK/ EPİGENETİK ALTERASYONLARI VE PROGNOSTİK DEĞERİ**

Oya İNCEKARA

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Tolga ACUN

Haziran 2022, 55 sayfa

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında görülme sıklığı en yüksek kanser türüdür. Heterojen yapıda ve kemoterapiye direnç mekanizmaları geliştirebilen bir kanser türü olması sebebiyle, meme kanserinin tedavisine, tanısına ve prognozuna yönelik hedef genlerin belirlenmesi önemlidir. Isı şoku proteinleri (HSP) son yıllarda sıklıkla kanserlerle ilişkili gösterilmektedir ve birçoğu biyobelirteç ve anti-kanser ilaç hedefi olarak önerilmiştir. *DNAJC9*, HSP ailesi üyesidir ve önceki çalışmalarda *DNAJC9* ifadesi karsinogenez ve radyoterapi direnci ile ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada, *DNAJC9* geninin ifadesi, genetik alterasyonları, promotor metilasyon düzeyi ve meme kanserinde sağ-kalıma etkisi meme hücre hatlarında ve meme kanseri klinik örneklerinde analiz edilmiştir.

DNAJC9 geninin mRNA ifadesi, meme hücre hatlarında (BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1, MCF 10A) multipleks semi kantitatif-RT-PCR ve kantitatif-RT-PCR (Q-RT-PCR) yöntemleri ile incelenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattındaki *DNAJC9* mRNA seviyesi,

ÖZET (devam ediyor)

tümörijenik olmayan meme epitel hücre hattına (MCF 10A) göre yüksek (> 2 kat) bulunmuştur. BT-20, ZR-75-1, SK-BR-3 hücre hatlarında, MCF 10A 'ya kıyasla anlamlı bir ifade farklılığı gözlenmemiştir.

Meme kanseri klinik örneklerindeki *DNAJC9* ifadesi, meme kanseri alt tiplerini de kapsayacak şekilde Breast Cancer Gene-ExpressionMiner (bc-GenExMiner v4.8) *in-siliko* aracını kullanarak incelenmiştir. DNA mikroarray ve RNA-seq verisetlerine göre; *DNAJC9* mRNA ifadesi, basal-benzeri, HER2-E, luminalB alt tiplerinde, normal meme-benzeri örneklerle kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($P < 0.0001$). *DNAJC9* geninin genetik alterasyonları meme hücre hatlarında ve meme kanseri klinik örneklerinde, sırasıyla, dizileme yoluyla ve Sanger-COSMIC veri tabanında araştırılmıştır. Meme hücre hatlarında, *DNAJC9* geninin kor promotor bölgesinde mutasyon tespit edilmemiştir. Sanger COSMIC (v95) veri tabanındaki bilgilere göre meme kanseri klinik örneklerinde de mutasyon oranı oldukça düşüktür ($< \% 1$). *DNAJC9* geninin promotor bölgesi metilasyon durumu, birleşik bisülfitrestriksiyon analizi (COBRA) yöntemi ile meme hücre hatlarında analiz edilmiş ve metilasyon tespit edilmemiştir. Promotor metilasyon düzeyi, UALCAN *in-siliko* aracı ile klinik örneklerde de incelenmiştir. Meme kanseri klinik örneklerinde, alt tiplere ait örneklerde ve normal örneklerde promotor bölgesi hipometile bulunmuştur (beta değeri < 0.25). Çalışmanın son kısmında, *DNAJC9* geninin mRNA ifadesinin hasta sağkalımına etkisi, DNA mikroarray ve RNA-seq veri setlerinde, Breast Cancer Gene-ExpressionMiner (bc-GenExMiner; v4.8) *in-siliko* aracını kullanarak incelenmiştir. *DNAJC9* mRNA ifadesi, meme kanseri hastalarında, tam sağ kalım (OS), hastalıksız sağ kalım (DFS) ve uzak metastazsız sağ kalım (DMFS) değerlerini olumsuz etkilemektedir.

Sonuç olarak, yüksek *DNAJC9* ifadesi meme kanserinde olumsuz sağ kalım değerleri ile ilişkilidir ve bir biyobelirteç adayı olarak önerilebilir. Promotor metilasyonunun *DNAJC9* gen ifadesine etkisinin olmadığını düşünmekle birlikte, histon modifikasyonları, miRNA'lar, antisens-RNA'lar gibi diğer epigenetik etmenlerin *DNAJC9* ifadesine olan etkileri araştırılmalıdır. *DNAJC9* geninin meme karsinogeneziindeki öneminin daha iyi anlaşılması için fonksiyonel araştırmalara da ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *DNAJC9*, ifade, meme kanseri, metilasyon, sağ kalım

Bilim Kodu: 401.02.00

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

EXPRESSION, GENETIC/EPIGENETIC ALTERATIONS AND PROGNOSTIC VALUE OF *DNAJC9* GENE IN BREAST CANCER

Oya İNCEKARA

**Zonguldak Bülent Ecevit University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology**

Thesis Advisor: Assist. Prof. Dr. Tolga ACUN

June 2022, 55 pages

Breast cancer is the most common type of cancer among women in the world. It is important to identify target genes for the treatment, diagnosis, and prognosis of breast cancer, since it is a heterogeneous type of cancer that can develop mechanisms of resistance to chemotherapy. Heat shock proteins (HSP) have been shown to be frequently associated with cancers in recent years, and many of them have been proposed as biomarkers and anti-cancer drug targets. *DNAJC9* is a member of the HSP family, and *DNAJC9* expression has been associated with carcinogenesis and radiotherapy resistance in previous studies. In this study, the expression of *DNAJC9* gene, its genetic alterations, the level of promoter methylation and its effect on breast cancer survival were analyzed in breast cell lines and breast cancer clinical samples.

DNAJC9 mRNA expression was examined in breast cell lines (BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1, MCF 10A) by multiplex semi-quantitative-RT-PCR and quantitative-RT-PCR (Q-RT-PCR) methods. *DNAJC9* mRNA level in the MDA-MB-231 cell line was found to be

ABSTRACT (continued)

higher (> 2 fold) compared to the non-tumorigenic breast epithelial cell line (MCF 10A). No significant expression difference was observed in BT-20, ZR-75-1, SK-BR-3 cell lines compared to MCF 10A.

DNAJC9 expression in breast cancer clinical samples, including breast cancer subtypes, was examined by using Breast Cancer Gene-Expression Miner (bc-GenExMiner v4.8) *in silico* tool. According to DNA microarray and RNA-seq datasets; *DNAJC9* mRNA expression was significantly higher in basal-like, HER2-E, luminalB subtypes compared to normal breast-like samples ($P < 0.0001$). Genetic alterations of the *DNAJC9* gene were investigated in breast cell lines and breast cancer clinical specimens, by sequencing and in the Sanger-COSMIC database, respectively. No mutations were detected in the core promoter region of the *DNAJC9* gene in breast cell lines. According to the information in the Sanger COSMIC (v95) database, the mutation rate in breast cancer clinical samples is low ($< \% 1$). The methylation status of the promoter region of the *DNAJC9* gene was analyzed by the combined bisulfite restriction analysis (COBRA) method in breast cell lines and no methylation was detected. The level of promoter methylation was also investigated in clinical samples with the *in silico* vehicle of UALCAN. The promoter region was found to be hypo methylated in clinical breast cancer samples, samples of subtypes, and normal samples (beta value < 0.25). In the final part of the study, the effect of *DNAJC9* mRNA expression on patient survival was examined in DNA microarray and RNA-seq data set using the Breast Cancer Gene-ExpressionMiner (bc-GenExMiner; v4.8) *in silico* tool. *DNAJC9* mRNA expression negatively affects overall survival (OS), disease-free survival (DFS), and distant metastasis-free survival (DMFS) values in breast cancer patients.

In conclusion, high *DNAJC9* expression is associated with unfavorable survival values in breast cancer and could be suggested as a biomarker candidate. Although, we think that promoter methylation has no effect on *DNAJC9* gene expression, the effects of other epigenetic factors such as histone modifications, miRNAs, antisense-RNAs on *DNAJC9* expression should be investigated. Functional studies are also needed to better understand the importance of the *DNAJC9* gene in breast carcinogenesis.

Keywords: *DNAJC9*, expression, breast cancer, methylation, survival

Science Code: 401.02.0

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimim de dahil olmak üzere yüksek lisans eğitimim süresince her ne koşulda olursa olsun dürüst adımlarla ilerlemeyi hayat felsefem olarak benimsememi teşvik eden, başarılı bir bilim insanı olabilmem adına kıymetli tecrübelerini ve bilgilerini zaman gözetmeksizin paylaşan, çalışma düzeni ve disipliniyle örnek aldığım ve bundan sonra da almaya devam edeceğim sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tolga ACUN 'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca, pek çok konuda desteklerini ve engin tecrübelerini esirgemediğim paylaştığım sayın hocalarım Prof. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL, Dr. Öğr. Üyesi Arzu EROL, Dr. Öğr. Üyesi Kerem Mert ŞENSES, Araş. Gör. Aycan ÇELİK ve Araş. Gör. Utku Can ATILGAN 'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne kadar başarılı olmam ve sağlam adımlarla ilerlemem konusunda her daim maddi ve manevi desteklerini esirgemediğim yanımda olan, varlıklarını her adımında arkamda hissettiğim aileme, babam Muhammet İNCEKARA, annem Gülbahar İNCEKARA ve ablam Burcu AÇIKGÖZ 'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1 ve MCF 10A hücre hatlarını bize sağlayan Doç. Dr. Işık Yuluğ 'a (Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye) ve projemizi destekleyen Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi'ne (BAP Proje No:2020-50737594-02) teşekkürlerimi iletirim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL:	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
 BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	 1
1.1 MEME KANSERİ.....	1
1.1.1 Non-İnvaziv Meme Kanseri.....	2
1.1.2 İnvaziv Meme Kanseri.....	2
1.2 MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER ALT TİPLERİ	3
1.3 HSP	6
1.3.1 <i>DNAJC9</i>	11
 BÖLÜM 2 MATERYAL VE YÖNTEMLER	 15
2.1 MATERYALLER	15
2.1.1 Hücre Hatları.....	15
2.1.2 Klinik Örnekler	15
2.1.2.1 İfade Analizinde Kullanılan Veri Setleri.....	15
2.1.2.1.1 DNA Mikroarray Veri Setleri.....	15
2.1.2.1.2 RNA-Seq Veri Setleri.....	17
2.1.2.2 Sağ Kalım Analizlerinde Kullanılan Veri Setleri.....	17

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	Sayfa
2.1.2.2.1 DNA Mikroarray Veri Setleri.....	17
2.1.2.2.2 RNA- Seq Veri Setleri.....	21
2.2 YÖNTEMLER.....	22
2.2.1 DNA İzolasyonu	22
2.2.2 cDNA Sentezi	23
2.2.3 Bisülfite Modifikasyonu	24
2.2.4 PCR.....	24
2.2.5 Q-RT-PCR, Semi Kantitatif RT-PCR.....	25
2.2.6 Yararlanılan <i>İn-Siliko</i> Araçlar.....	26
2.2.7 Mutasyon Analizi.....	26
2.2.8 Metilasyon Analizi.....	27
2.2.8.1 COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)	27
2.2.8.2 Metilasyon Analizi İçin Kullanılan <i>İn-Siliko</i> Araçlar.....	27
BÖLÜM 3 BULGULAR.....	29
3.1 <i>DNAJC9</i> GENİNİN MEME KANSERİNDE mRNA İFADE ANALİZİ.....	29
3.1.1 Meme Hücre Hatlarında <i>DNAJC9</i> Geninin mRNA İfade Analizi.....	29
3.1.2 Meme Kanseri Klinik Örneklerinde <i>DNAJC9</i> Geninin mRNA İfade Analizi.....	30
3.1.2.1 DNA Mikroarray Veri Setlerinde <i>DNAJC9</i> Geninin mRNA İfade Analizi.....	30
3.1.2.2 RNA- Seq Veri Setlerinde <i>DNAJC9</i> Geninin mRNA İfade Analizi.....	31
3.2 <i>DNAJC9</i> GENİNİN MEME KANSERİNDEKİ GENETİK ALTERASYONLARI.....	33
3.2.1 Meme Hücre Hatlarında <i>DNAJC9</i> Geninin Promotor Mutasyon Analizi.....	33
3.2.2 Meme Kanseri Klinik Örneklerinde <i>DNAJC9</i> Geninin Mutasyon Analizi.....	33
3.3 <i>DNAJC9</i> GENİNİN MEME KANSERİNDE PROMOTOR METİLASYON ANALİZİ.....	34
3.3.1 Meme Hücre Hatlarında <i>DNAJC9</i> Geninin Promotor Metilasyon Analizi	34
3.3.2 Meme Kanseri Klinik Örneklerinde <i>DNAJC9</i> Geninin Promotor Metilasyon Analizi.....	35
3.4 <i>DNAJC9</i> GENİNİN mRNA İFADESİNİN MEME KANSERİ SAĞ KALIM DEĞERLERİNE ETKİSİ.....	36
3.4.1 DNA Mikroarray Veri Setlerinde Sağ Kalım Değerleri	36

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

3.4.2 RNA-Seq Veri Setlerinde Sağ Kalım Değerleri	37
3.4.3 <i>DNAJC9</i> Geninin mRNA İfadesinin Meme Kanseri Alt Tiplerinde Sağ Kalım Değerlerine Etkisi	39
BÖLÜM 4 SONUÇ VE TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR.....	45
EK AÇIKLAMALAR	51
ÖZGEÇMİŞ	55



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Meme dokusu şeması	1
Şekil 1.2 Meme kanseri hücre hatları ve tümörler arasındaki moleküler alt tipler görseli	3
Şekil 1.3 2018 yılında kadın meme kanserleri için bölgeye özgü insidans ve mortalite yaşa göre sınıflandırılan çubuk grafiği görseli	5
Şekil 1.4 2013 nüfus sayımı verilerine göre kadınlarda tahmini yaşa göre ayarlanmış meme kanseri risk durumu.	6
Şekil 1.5 HSP-70-DNAJ kompleksi tarafından önerilen şaperon destekli protein katlama modeli	7
Şekil 1.6 Hsp40 ailesinin farklı alan yapılarına sahip üyeleri ve 3 farklı alt tipi görseli	7
Şekil 1.7 Meme hücrelerinde HSP'nin mutasyon ile ilişkisi	9
Şekil 1.8 Hsp90 homologlarında alan organizasyonunun korunması	10
Şekil 1.9 Meme hücresi karsinogenez görseli.....	11
Şekil 1.10 <i>DNAJC9</i> 'un 10.kromozom üzerindeki lokasyonu	12
Şekil 1.11 <i>DNAJC9</i> 'a ait olan üç transkript.....	13
Şekil 2.1 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan GeneRuler™ DNA Ladder Mix.....	25
Şekil 3.1 Meme kanseri hücre hatlarında MCF 10A hücre hattına göre <i>DNAJC9</i> mRNA ekspresyonu.....	29
Şekil 3.2 Meme kanseri alt tiplerindeki <i>DNAJC9</i> mRNA ifadesi, DNA mikroarray veri setlerinde.....	30
Şekil 3.3 a) Meme Kanseri Alt Tiplerindeki <i>DNAJC9</i> ifadesinin istatistik analizi. b) Meme kanseri alt tiplerindeki <i>DNAJC9</i> ifadelerin dağılımı.....	31
Şekil 3.4 Meme kanseri alt tiplerindeki <i>DNAJC9</i> mRNA ifadesi, RNA-seq veri setlerinde.....	32
Şekil 3.5 a) Meme Kanseri Alt Tiplerindeki <i>DNAJC9</i> ifadesinin istatistik analizi. b) Meme kanseri alt tiplerindeki <i>DNAJC9</i> ifadelerin dağılımı.....	32
Şekil 3.6 UCSC genom tarayıcısından alınan görselde <i>DNAJC9</i> geninin promotor bölgesi (<i>DNAJC9_1</i>).....	33
Şekil 3.7 Sırasıyla, BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1 ve MCF 10A hücre hatlarına ait, <i>DNAJC9</i> promotor bölgesini de gösteren dizileme sonuç görselleri.....	34
Şekil 3.8 <i>DNAJC9</i> COBRA sonucu ..	35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No

Sayfa

Şekil 3.9 <i>DNAJC9</i> promotör bölgesi meme kanseri klinik örneklerinde ve alt tiplerinde hipometiledir.	36
Şekil 3.10 Meme kanseri hastalarında DNA mikroyarray verileri.....	37
Şekil 3.11 Meme kanseri hastalarında RNA-Seq verileri.	38



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Meme kanserinde moleküler alt tiplerin sınıflandırılması	4
Çizelge 1.2 HSP40 ailesine ait olan bazı DNAJ'ların ilişkili bulunduğu kanserler ve kromozom lokasyonları	11
Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan meme hücre hatlarına ait moleküler alt tip bilgileri	22
Çizelge 3.1 <i>DNAJC9</i> geninin Sanger-COSMIC veritabanında genetik alterasyonları.	33
Çizelge 3.2 Meme kanseri PAM50 alt tiplerinin Kaplan-Meier sağkalım analizleri.....	39
Çizelge A.1 Genomik DNA ve RNA Konsantrasyonları.....	51
Çizelge A.2 <i>DNAJC9</i> Bisülfıt Nested Primerleri	51
Çizelge A.3 <i>DNAJC9</i> Dizileme Primerleri	51
Çizelge A.4 <i>DNAJC9</i> Q-RT-PCR ve Semi Kantitatif RT-PCR Primerleri.....	52
Çizelge B.1 <i>DNAJC9</i> Nested PCR Koşulları	53



EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ

Sayfa

Ek A: Konsantrasyonlar ve Primer Çiftleri	51
Ek B: PCR Koşulları	53





SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

©	: Copyright Sign
Δ	: Delta
μ	: Mikro
M	: Molar
®	: Registered Sign
°C	: Santigrat Derece

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
BAX	: Bcl-2-associated X protein
BP	: Base Pair
CHIP	: Chromatin Immunoprecipitation
COBRA	: Combined Bisulfite Restriction Analysis
cDNA	: Complementary Deoxyribonucleic Acid
COSMIC	: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CT	: Cycle Threshold
DAB	: Diaminobenzidin
Dk	: Dakika
DMFS	: Distant Metastasis Free Relapse
DNA	: Deoksiribonükleik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

DPX	: Distyrene-Plasticizer-Xylene
EPD	: Eukaryotic Promoter Database
HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIPAA	: Health Insurance Portability and Accountability Act
HSF1	: Heat Shock Factor 1
HSP	: Heat Shock Protein
HSP27	: Heat Shock Protein 27
HSP40	: Heat Shock Protein 40
HSP60	: Heat Shock Protein 60
HSP70	: Heat Shock Protein 70
HSP90	: Heat Shock Protein 90
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
ER	: Endoplasmic Reticulum
ER	: Estrogen Receptor
ER-	: Estrogen Receptor Negative
ER+	: Estrogen Receptor Positive
FBE	: Fen Bilimleri Enstitüsü
FISH	: Fluorescence In Situ Hybridization
HK	: Hepatosellüler Karsinoma
IHC	: İmmünohistokimya
KM	: Kaplan Meier
KSHV	: Kaposi's sarcoma – associated herpesvirus
LCIS	: In Situ Lobüler Karsinoma
LncRNA	: Long non-coding RNA
m-RNA	: Messenger RNA
mi-RNA	: mikro RNA
MBC	: Metastatic Breast Cancer
MSP	: Metylation Spesific Polimerase Chain Reaction
MD	: Orta Alan
NO	: Nitric Oxide
NF-κB	: Nuclear factor kappa B
CTD	: C-Terminal Alan

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

NTD	: N-Terminal Alan
OS	: Overall Survival
PR	: Progesterone Receptor
Q-RT-PCR	: Quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction
RFS	: Relapse Free Survival
RPM	: Repeat Per Minute
SAM	: S-adenosil metionin
Sn	: Saniye
UV	: Ultraviyole
TAE	: Tris Acetic Acid
TBS	: Tris Buffered Saline
TE Buffer	: Tris-Edta Buffer
TM	: Tissue Microarray
TNM	: Tümör-Nod Metastaz
ZBEÜ	: Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi



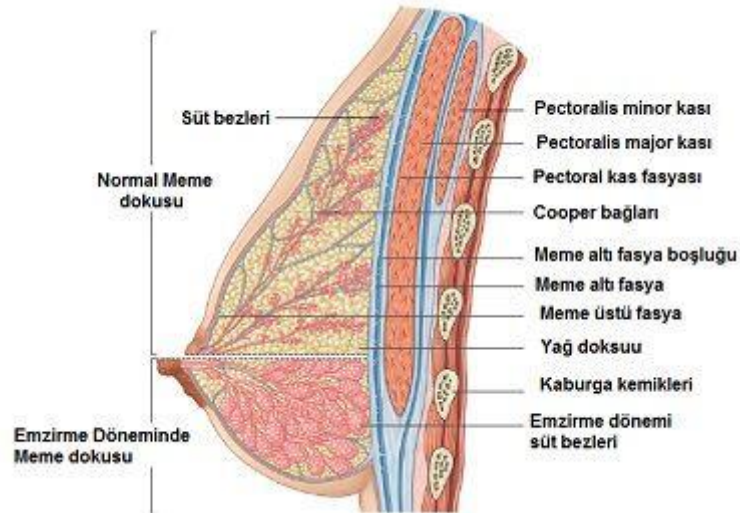
BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 MEME KANSERİ

Memedeki temel anatomik yapılar, tümü göğüs duvarı üzerinde konumlandırılmış deri, yağ, fasiyal tabakalar, cooper bağları, fibroglandüler doku, lenfatikler ve nörovasküler yapılardır. Erkeklerde meme parankimi genellikle sadece yağdan oluşur ve fibroglandüler doku yoktur (Jesinger 2014).

Meme, meme ucundan yayılan 15-20 lobdan oluşur. Her lob, yağ ve lifli bağ dokusu ile çevrilidir ve birçok lobüle bölünmüştür. Lobül (bazen duktal-lobüler birim olarak da adlandırılır) memenin temel yapısal birimidir ve epitel hücrelerle kaplıdır (Al-Naggar 2014) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Meme dokusu şeması (Buzoğlu 2020).

Meme kanseri, lobül adı verilen süt üretimi için gereken bezleri ve lobülleri meme ucuna bağlayan kanalları içeren meme dokusunda hücrelerin düzensizce büyümesi ile başlar (Al-Naggar 2014).

En yaygın meme kanseri, invaziv duktal karsinomdur ve tüm invaziv meme kanserlerinin yaklaşık % 85 'i duktal kökenlidir. Kalan % 15 lobülleri hizalayan hücrelerde başlar (lobüler karsinom). Karsinomatöz olmayan meme kanserleri nadirdir ve memenin bağ dokularından kaynaklanır. İnvaziv lobüler karsinom ve meme sarkomu veya meme lenfoması gibi diğer nadir görülen histolojiler çok daha az yaygındır. Memenin invaziv olmayan karsinomu, in situ duktal karsinomu ve in situ lobüler karsinomu içerir (Al-Naggar 2014).

Tüm kötü huylu kanserler arasında meme kanseri, tüm kanser ölümlerinin % 23 'ünü oluşturur ve menopoz sonrası kadınlarda önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Akram vd. 2017).

Meme kanseri türleri, invaziv ve non-invaziv meme kanserleri olarak ikiye ayrılır (Akram vd. 2017).

1.1.1 Non-İnvaziv Meme Kanseri

Bulunduğu lobül veya kanallardan uzaklaşmamış bir kanserdir. İn situ duktal karsinoma ve in situ lobüler karsinoma (LCIS) invaziv olmayan meme kanseri örneğidir (Akram vd. 2017).

1.1.2 İnvaziv Meme Kanseri

Lobüllerin veya süt kanallarının içindeki anormal hücrelerin meme dokusuna yayılması ile ortaya çıkar. Kanser hücreleri, bağışıklık sistemi veya sistemik dolaşım yoluyla memeden vücudun farklı bölgelerine geçebilir. Medüller karsinoma, infiltratif lobüler karsinoma, infiltratif duktal karsinoma, tübüler karsinoma invaziv meme kanseri örneğidir (Akram vd. 2017).

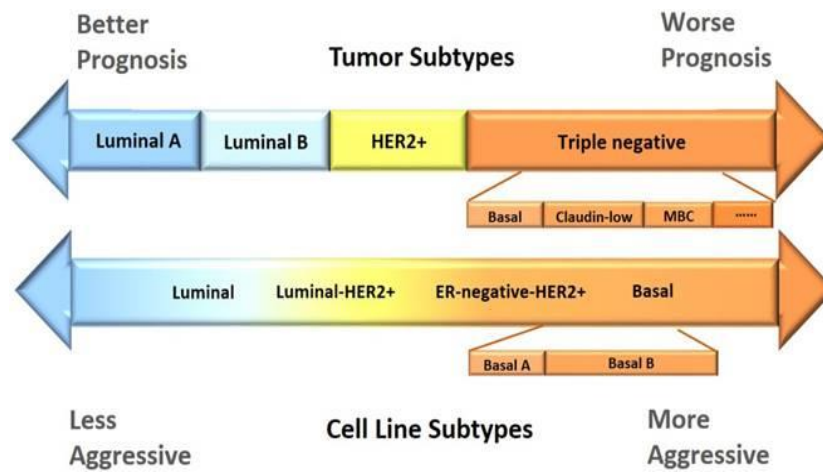
1.2 MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER ALT TİPLERİ

Meme kanseri, bir anatomik bölgeyi etkileyen ancak fenotipik olarak değişken olan heterojen bir hastalıktır.

Bugüne kadar yapılan bazı çalışmalar farklı biyolojik alt tiplerin, tedavi yanıtındaki ve hastalığa özgü sonuçlardaki varyasyonlarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Tümör morfolojisi, derece sınıflandırması, tümör boyutu, lenf düğümü metastazlarının varlığı ve ER, PR ve HER2 ekspresyonu dahil olmak üzere çeşitli faktörlere dayanmaktadır (Fragomeni vd. 2018).

Çoklu gen imzaları, meme kanserinde biyolojik kavrama ve risk sınıflandırması sağlar. 2009 yılında, Parker ve ark. meme kanserinin “içsel” alt tiplerini sınıflandırmak için minimal bir gen seti (PAM50) türetmiştir. Bu içsel moleküler alt tipler, 50 genin (PAM50) mRNA ekspresyonu ile tanımlanmaktadır ve bu sınıflandırmanın, prognozu önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir. PAM50 sisteminine göre meme kanseri alt tipleri: Luminal A, Luminal B, Basal, Her2-enriched, ve normal-benzeri şeklinde tanımlanmıştır. Bunun gibi mevcut sistemlerin kullanılmasına ve geliştirilmesine yönelik yaklaşımlar bağımsız biyobelirteçlerin prognostik değerini değerlendirmeyi sağlamaktadır (Pu 2020).

Ayrıca, hem Perou hem de Sorlie, meme kanserinin farklı alt tiplere göre sınıflandırılabilirliğini göstermiştir. Bu alt tipler: luminal ER pozitif (luminal A ve luminal B), HER2-pozitif ve bazal benzeri olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 1.2) (Howlader vd. 2018).



Şekil 1.2 Meme kanseri hücre hatları ve tümörler arasındaki moleküler alt tipler görseli (Dai vd. 2017).

Ortak HR / HER2 durumu ile yaklaştırılan dört ana moleküler alt tip şunlardır: HR + / HER2– (yani yaklaşık Luminal A alt tipi), HR + / HER2 + (Luminal B), HR– / HER2 + (HER2-zenginleştirilmiş) ve HR– / HER2 - (üçlü negatif) (Şekil 1.2) (Howlader vd. 2018).

Çizelge 1.1 Meme kanserinde moleküler alt tiplerin sınıflandırılması (Fragomeni SM vd. 2018).

Moleküler alt tip	ER	PR	HER 2
Luminal A	pozitif	ve/veya pozitif	negatif
Luminal B	pozitif	ve/veya pozitif	negatif
Luminal B	pozitif	ve/veya pozitif	pozitif
HER2	negatif	negatif	pozitif
Triple negative or basal-like	negatif	negatif	negatif

*(PR < 20 % + Ki 67 > 14 %)

** (Any PR + any Ki 67)

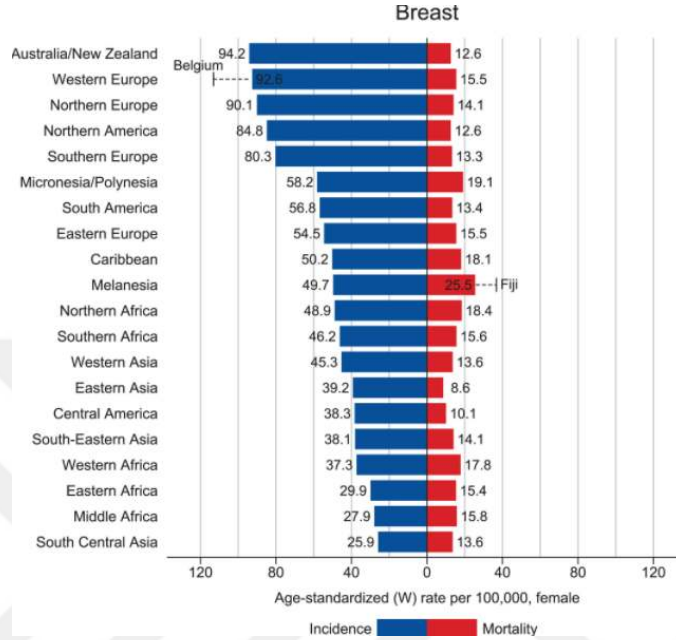
ER – östrojen reseptörü; HER2 – insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; PR – progesteron reseptörü

St. Gallen 2013 sınıflandırmasına göre Ki67 hücre proliferasyonunun bir belirteçidir. Luminal B, HER2-negatif alt tipi ile ilişkili faktörler olarak % 20 'den daha düşük bir PR kesintisini içermiştir (Fragomeni vd. 2018) (Çizelge 1.1).

Meme kanserlerinin yaklaşık % 40 'ı luminal A 'dır ve bu onu en yaygın meme kanseri alt tipi yapar. Bu tümörler ER + ve / veya PR + ve HER2- olma eğilimindedir, yavaş büyür ve diğer alt tiplere göre daha az agresiftir, yaklaşık % 10 ila % 20 'si luminal B 'dir. Lüminal A tümörleri gibi, çoğu luminal B tümörü ER + ve / veya PR + 'dır, ancak HER2 ekspresyonu veya yüksek proliferasyon oranları (aktif olarak bölünen yüksek sayıda kanser hücresi) ile ayırt edilirler (Al-Naggar 2014).

Meme kanserlerinin yaklaşık % 10 ila % 20 'si bazal benzeri olup, bazal benzeri meme kanserlerinin çoğu ER-, PR- ve HER2- oldukları için “üçlü negatif” olarak adlandırılır. Bazal benzeri meme kanseri teşhisi konan kadınlar, diğer meme kanseri türleriyle teşhis edilenlere göre daha zayıf bir kısa vadeli prognoza sahiptir çünkü bu tümörler için hedefe yönelik tedaviler yoktur. Meme kanserlerinin yaklaşık % 10 'u fazladan HER2 (büyümeyi destekleyen protein) üretir ve hormon reseptörlerini (ER- ve PR-) ifade etmez. Bu kanserler diğer meme kanserlerinden daha agresif bir şekilde büyüme ve yayılma eğilimindedir ve ER + meme kanserlerine kıyasla daha kötü kısa vadeli prognozla ilişkilidir (Al-Naggar 2014).

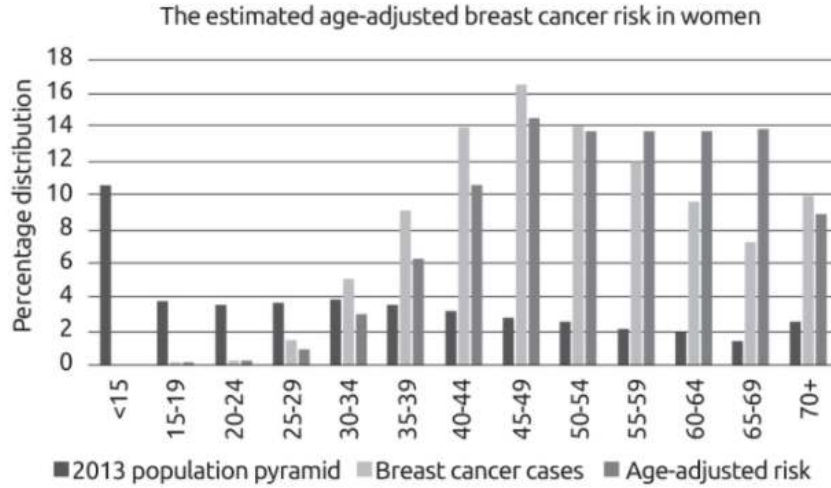
Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve dünya çapında neredeyse dört kanserden birini oluşturur ve aynı zamanda 2018 'de tahminen 627.000 ölümle kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (Cakmak vd. 2020). Ayrıca meme kanseri dünyanın 11 bölgesinde en sık ölüm nedeni olmuştur (Ferlay vd. 2019).



Şekil 1.3 2018 yılında kadın meme kanserleri için bölgeye özgü insidans ve mortalite yaşa göre sınıflandırılan çubuk grafiği görseli (Bray vd. 2018, GLOBOCAN 2018).

Yirmi dünya bölgesindeki coğrafi değişkenliğe odaklanarak Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından üretilen GLOBOCAN 2018 kanser insidansına bakıldığında kadınlar arasında meme kanseri en sık teşhis edilen kanserdir ve kanserden ölümlerin önde gelen nedenidir (Şekil 1.3) (Bray vd. 2018).

Meme kanseri, Türkiye 'de kadınlarda en sık görülen kanser türü ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Türkiye Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu Ulusal Meme Kanseri Kayıt Programına kayıtlı hastalara bakıldığı zaman Mayıs 2005 ile Nisan 2017 arasında yirmi bin hasta kaydedilmiştir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 2013 nüfus sayımı verilerine göre kadınlarda tahmini yaşa göre ayarlanmış meme kanseri risk durumu. Yaş ortalaması 51 olarak belirlenmiştir (Özmen vd. 2019).

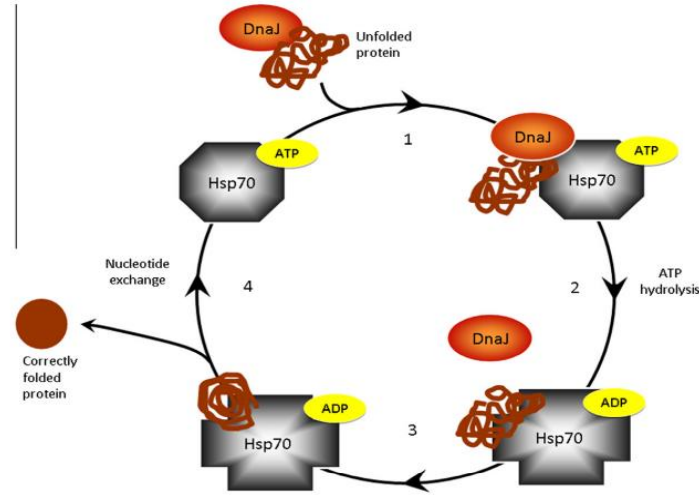
Meme karsinogenezinde daha fazla araştırma yapmak, yeni genler belirlemek meme kanseri tedavisinde ve tanısında oldukça önemlidir. Ayrıca ısı şoku proteinleri (heat-shock proteins, HSP) bu konuda incelenmesi gereken önemli bir noktadır (Cho 2007, Khalil vd. 2011).

1.3 HSP

Heat shock proteinleri, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunabilen, sitoplazma, çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondride bulunan eski ve yüksek oranda korunmuş bir protein sınıfını temsil eder (Fagone vd. 2012).

Apoptoz, sinyal iletimi, hücre döngüsü regülasyonu başta olmak üzere transkripsiyonel aktivasyonu etkiler. Moleküler şaperon olarak görev alırlar. Yani proteinlerin doğru katlanmalarına, translokasyonlarına ve yıkımlarına yardımcı olur. Ayrıca agregasyonlarını baskılar ve ekspresyonları stres tarafından hızla düzenlenir (Sterrenberg vd. 2011).

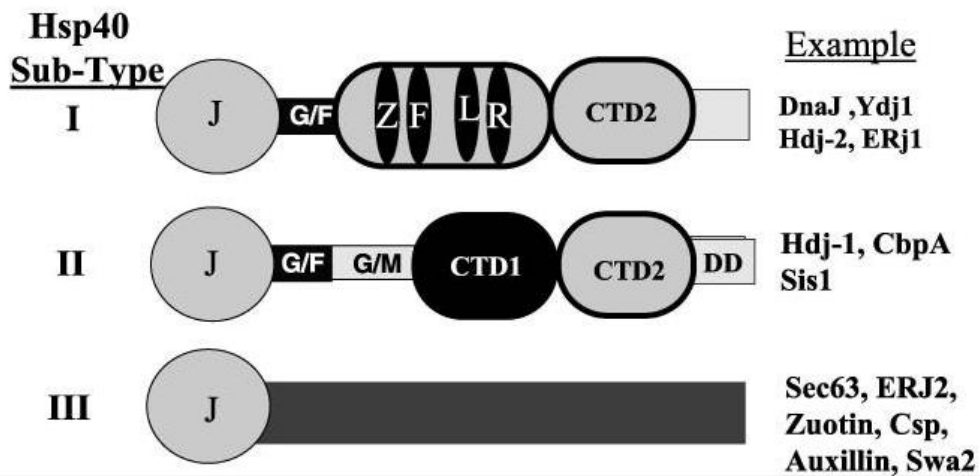
DNAJ(HSP40) ailesi insanlardaki en fazla üyeye sahip HSP ailesidir. Korunmuş bir J-alanının varlığı ile tanımlanır. Bu J bölgesi Hsp70 'in ATPase aktivitesini uyarır (Fagone vd. 2012).



Şekil 1.5 HSP-70-DNAJ kompleksi tarafından önerilen şaperon destekli protein katlama modeli (Sterrenberg vd. 2011).

DNAJ proteinlerinin “J” bölgesi, HSP70 ile bağlantıda ve HSP70 ’in ATPaz kısmını uyarmada en önemli rolü üstlenir. ATPaz kısmının uyarılması ile ATP ADP ’ye hidrolize olur ve bu sayede HSP70 ’in substratlarına bağlanma gücü ve yatkınlığı oldukça artar, stabil bir HSP70-substrat kompleksi oluşması sağlanır.

HSP ’ler, beş alt aileye bölünmüştür ve 95 gen içeren evrimsel olarak korunmuş bir gen ailesine aittir. Bunlar: Şaperonin alt ailesi (CHAP) altında gruplanan tip I şaperoninler (HSP10 ve HSP60) ve BBs şaperoninler ve tip II şaperoninler (CCT genleri); HSP70 (HSPA) ve büyük HSP 100–110 kDa (hepsi HSP70 ailesine dahildir); Küçük HSP 12-43 kDa (HSPB); HSP90 (HSPC); ve HSP40 (DNAJ) aileleridir (Zoppino vd. 2018).



Şekil 1.6 Hsp40 ailesinin farklı alan yapılarına sahip üyeleri ve 3 farklı alt tipi görseli (Chun-Yang vd. 2003).

J, J- alanı; G/F, glisin ve fenilalanin bakımından zengin bölge; ZFLR, çinko parmak benzeri bölge; G/M, glisin ve metiyonin bakımından zengin bölge; CTD1, karboksil-terminal bölge1; CTD2, karboksil-terminal bölge 2; DD, dimerizasyon alanı iken J-alanı tüm HSP-40 proteinlerinde bulunur ve HSP70 'in ATP hidrolitik döngüsünün düzenlenmesinden sorumludur (Şekil 1.6) (Chun-Yang vd. 2003).

Tip I- DNAJA; Tip II- DNAJB; Tip III DNAJC olarak isimlendirilir (Sterrenberg vd. 2011). Isı şoku proteini (HSP) seviyeleri meme kanserinde yüksektir ve yeni tedaviler için moleküler hedeflerdir. HSP 'ler ilk olarak protein denatürasyonuna yol açan streslere maruz kalan normal hücrelerde büyük miktarlarda indüklenen proteinler olarak gözlenmiştir (Calderwood vd. 2012).

HSP 'ler Başlangıçta ısı şoku gibi proteotoksik streslere maruz kalan hücrelerde oldukça bol hücrel proteinler olarak tespit edilmiştir ve derin stres direncine yol açan ısı şoku tepkisinin (HSR) önemli bileşenleri olduğu anlaşılmıştır (Lindquist ve Craig 1988).

HSP 'ler, içsel moleküler şaperon özelliklerinin aracılık ettiği kötü huylu transformasyon ve ilerlemede önemli roller oynar. Bu proteinler şu anda meme kanseri tedavisinde hedeflenmektedir ve Hsp90 için etkili ilaçlar sentezlenmiştir. Meme karsinom hücreleri ayrıca bol miktarda HSP-tümör antijen kompleksi içerir ve bu kompleksler, her bireyin kanseri için kişiselleştirilmiş tedavi sağlayan etkili tümör aşısı yaklaşımları geliştirmek için kullanılmaktadır (Calderwood vd. 2012).

Isı şoku proteinleri (Hsps), çeşitli sitotoksik ilaçlarla in vitro indüklenir; insan meme kanseri hücrelerinde bu proteinlerin anti-kanser ilaç direncinde rol oynadığı görülmektedir. Kemoterapi sonrası nükleer Hsp27 ve Hsp70 ekspresyonunun arttığı ve Hsp70 sitoplazmik ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Ayrıca tümör hücrelerinde yüksek nükleer Hsp70 oranının (> % 10), ilaç direnci ile önemli ölçüde korelasyon gösterdiği saptanmıştır (Vargas-Roig vd. 1998).

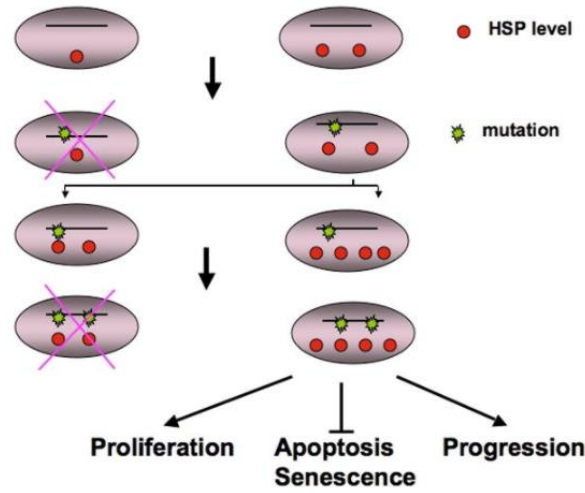
Hsp70 ve Hsp90, protein homeostazında yer alan hücrel mekanizmanın önemli bileşenleridir ve neredeyse her hücrel sürece katılırlar. Her biri bazı şaperon aktivitelerini bağımsız olarak gerçekleştirse de yeniden hücrel modelleme reaksiyonlarında işbirliği

yaparlar. Ökaryotlarda, hem Hsp90 hem de Hsp70, çok sayıda Hsp90 ve Hsp70 ko-şaperonlarıyla birlikte çalışır (Genest vd. 2019).

Zaman içinde yapılan çalışmalarla birlikte heat shock proteinlerin hücre dışı alanda mevcut olduğu ve işlev gördüğü gösterilmiştir. Hsp90alpha yüzeyde ve HT-1080 fibrosarkom hücrelerinin koşullandırılmış ortamında bulunmuştur. Burada, matriks metalloproteinaz-2 'nin (MMP2) aktivasyonuna yardımcı olan ve artan tümör invazivliğine yol açan moleküler bir şaperon görevi üstlenmektedir (Eustace vd. 2004).

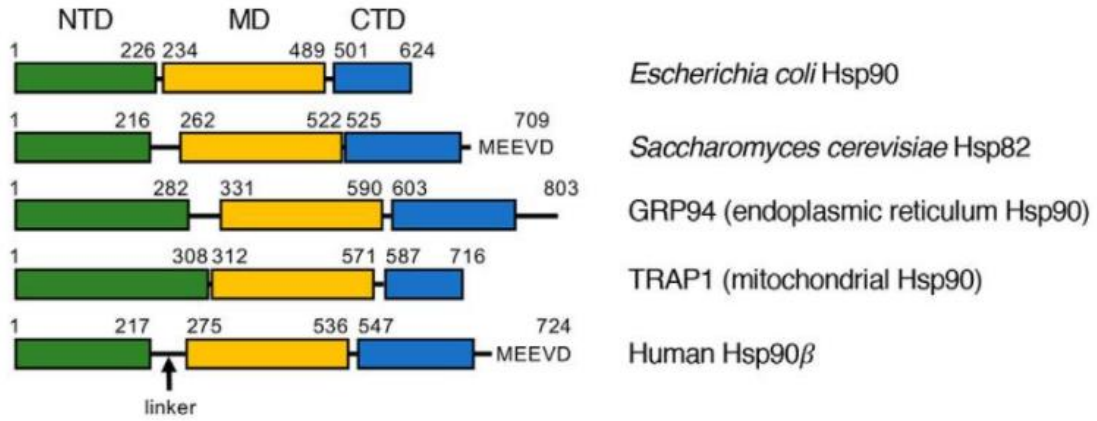
Hsp90 'daki lizin kalıntıların deasetile eden histon deasetilaz (HDAC) 6 'nın devreden çıkarılması, tersine çevrilebilir hiperasetilasyonu indükler ve hsp90 'ın ATP bağlanmasını ve şaperon fonksiyonunu zayıflatır (Yang vd. 2008).

Meme kanseri ölümlerinin bir çoğu metastazdan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle metastazın erken adımı olan, migrasyon ve invazyonun daha iyi anlaşılması meme kanseri metastazını inhibe eden tedavilerin geliştirilmesi için kritik öneme sahiptir. Ko-şaperon kompleksi, in-vitro ortamda MMP-2 'nin Hsp90 'a aracılı aktivasyonunu arttırırken, şartlandırılmış ortamda Hsp70 'in inhibisyonu, bu aktivasyonu azaltır. Kanser hücresi migrasyon ve invazyonu böylece azalmaktadır (Sims vd. 2011).



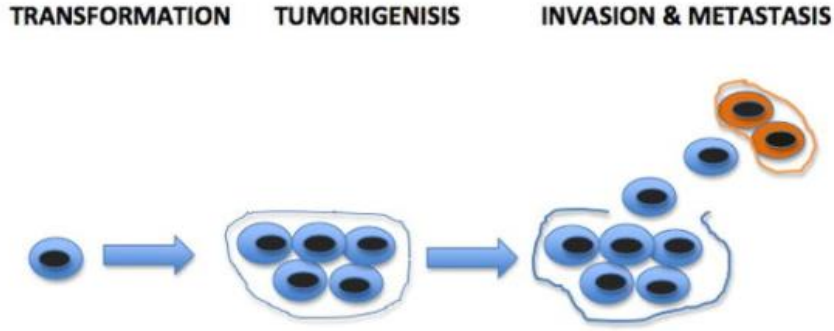
Şekil 1.7 Meme hücrelerinde HSP 'nin mutasyon ile ilişkisi (Calderwood vd. 2012).

Normal bir meme hücresi popülasyonunda mutant onkoproteinlerin ekspresyonuna yol açan bir tümör başlatan mutasyon meydana gelir. Yüksek HSP 'lere sahip hücrelerin aşırı büyümesini destekleyen onkoproteinin anormal konformasyonuna eşlik etmek için daha yüksek HSP seviyeleri gerekli olacaktır. Tumorigenesis genellikle çoklu mutasyon olaylarını içerir ve bunlar, protein stresiyle başa çıkmak için giderek daha yüksek HSP seviyelerine sahip hücreleri seçecektir. Dolayısıyla, yüksek HSP seviyeleri, meme tümörü hücre popülasyonunda genetik çeşitliliğin oluşmasına izin vererek, tümör fenotipinin evrimleşmesine yardımcı olur ve olumsuz koşullara ve tümör tedavisine yanıtı izin verir. Ayrıca ortaya çıkan tümör hücrelerinin apoptotik ölüm ve senesensden olduğunu kanıtlar, onkojenlere eşlik ederek proliferasyonu tetikler (Şekil 1.7) (Calderwood vd. 2012).



Şekil 1.8 Hsp90 homologlarında alan organizasyonunun korunması (Genest vd. 2019).

Hsp90, *E. coli* ve insanlar arasında ~% 50 sekans benzerliğine sahip oldukça korunmuş bir proteindir. Bir N-terminal alanı (NTD), orta alan (MD) ve bir C-terminal alanı dahil olmak üzere üç alandan oluşan her protomer ile bir homodimer olarak bulunur. Hsp90 protomerleri, ATP bağlanması ve hidrolizinde, bazı istemcilerle etkileşimde yer alan bir NTD (N-Terminal Domain, yeşil) içerir. Bağlamayı sağlayan ve Hsp70 ile doğrudan etkileşimde yer alan bir MD (Middle-Domain, sarı); ve dimerizasyon bölgesini içeren ve alıcı bağlanmasında rol oynayan bir CTD (C-Terminal Domain, mavi) içerir (Şekil 1.8) (Genest vd. 2019).



Şekil 1.9 Meme hücresi karsinogenezi görseli (Calderwood vd. 2012).

Meme hücresi karsinogenezinde ve meme kanseri ilerlemesinde HSF1 kötü huylu sinyalizasyonda, anti-metastatik genlerin gen baskısında, HSP-27 ile HSP-70 apoptoz ve senesensin inhibe edilmesinde, hücre sağkalımının artırılmasında HSP-90 ise onkogenin ekspresyonunda görev alır (Şekil 1.9) (Calderwood vd. 2012).

Yapılan çalışmalar ile HSP 'lerin pek çok farklı kanser türünde çeşitli görevler aldığı görülmüştür (Çizelge 1.2). Böylece kanserleşmede biyobelirteç ve potansiyel ilaç hedefleri olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Khalil vd. 2011; Sterrenberg vd. 2011). Örneğin HSP60 'ın meme kanserinde erken teşhiste biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörülmüştür (Bini vd. 1997).

Çizelge 1.2 HSP40 ailesine ait olan bazı DNAJ 'ların ilişkili bulunduğu kanserler ve kromozom lokasyonları (Kampinga vd. 2009, Mitra vd. 2009).

DNAJ	Alternatif İsim	Kanser Tipi	Kromozom
DNAJA1	HDJ2	Glioblastoma	9p13-p12
DNAJA3	Htid1	Meme	16p13.3
DNAJB4	HLJ1	Akciğer	1p31.1
DNAJB6	MRJ	Meme	11q24.3
DNAJC9	HDJC9	Akciğer	10q22.2
DNAJC12	JDP1	Meme	10q22.1
DNAJC15	MCJ	Beyin	13q14.1

1.3.1 DNAJC9

HSP40 'ın bir üyesi olan ve 10. kromozomun q kolunda bulunan (Şekil 1.10) ve tek bir transkriptten kodlanan (Şekil 1.11) *DNAJC9* (JDD1) 'un kemoterapi için biyobelirteç ya da

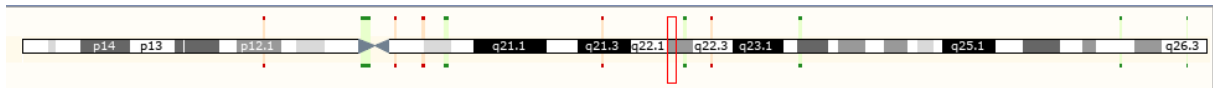
ilaç hedefi olarak kullanılabileceği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Khalil vd. 2011; Wu vd. 2007).

DNAJA1 (glioblastoma ve prostatta) ve *DNAJB11* (yumurtalık tümörlerinde) 'de olduğu gibi *DNAJC9* 'da kanser gelişimi ve metastazıyla ilişkilendirilmiştir (Buttacavoli vd. 2021). *DNAJC9* geninin ifadesi incelendiğinde metastatik serviks kanserlerinde, metastatik olmayanlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Lyng vd. 2006). İnsan embryonik kök hücrelerinde ve meme kanseri kök hücreleri incelendiğinde ise *DNAJC9* geninin ifadesi yüksek bulunmuştur (Van Hoof vd. 2006).

İki meme kanseri kohortu ile yapılan transkriptomik analiz incelendiğinde *DNAJC9* geninin luminal B, HER2+ ve bazal tipi meme kanserinde normal meme örneklerine göre fazla ifade olduğu görülmüştür (Zoppino vd. 2018).

Başka bir çalışmada ise *DNAJC9* ifadesi glioblastomalarda radyoterapi direnci ile ilişki bulunmuştur (Wang C vd. 2019) ve HSP 'ler arasında *DNAJC9* KM plotter analizine göre genel hayatta kalma ile pozitif yönde ilişkili ($p \leq 0,05$) bulunmuştur (Klimczak vd. 2019).

Bir başka çalışmada UALCAN çevrim içi aracıyla yapılan incelemeye göre *DNAJC9* promotorunun hipometile olduğu gözlenmiş. KM plotter aracında nüksüz hayatta kalma (RFS), genel hayatta kalma (OS) ve uzak metastazsız hayatta kalma (DMFS) verileri incelendiğinde ise yüksek mRNA ifadesinin sağ kalımı olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Buttacavoli vd. 2021).



Şekil 1.10 *DNAJC9* 10.q22.2 lokasyonunda bulunmaktadır (Görsel ENSEMBL 'dan alınmıştır) (Cunningham vd. 2022).

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype
DNAJC9-201	ENST00000372950.6	2295	260aa	Protein coding
DNAJC9-202	ENST00000453189.2	762	No protein	Processed transcript
DNAJC9-203	ENST00000469143.1	362	No protein	Processed transcript

Şekil 1.11 *DNAJC9* 'a ait olan üç transkriptten sadece bir tanesi protein kodlamaktadır. (Görsel ENSEMBL 'dan alınmıştır) (Cunningham vd. 2022).





BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Hücre Hatları

Çizelge 2.1 'de moleküler alt tip bilgileri belirtilen BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1 meme kanseri hücre hatları ve MCF 10A non-tümörijenik meme hücre hattı, Doç. Dr. Işık YULUĞ (Bilkent Üniversitesi, Ankara) tarafından sağlanmış ve ATCC (American Type Culture Collection) talimatlarına göre büyütülmüştür.

2.1.2 Klinik Örnekler

İfade ve sağ kalım analizlerinde kullanılan veri setleri ile ilgili bilgiler aşağıdaki gibidir.

2.1.2.1 İfade Analizinde Kullanılan Veri Setleri

2.1.2.1.1 DNA Mikroarray Veri Setleri

Ver	Study code	Original data		Filtered data		Final data
		Reference	No. patients	Subtyped -selected patients	Gene found	No. patients
1.0	Rosetta2002	<u>Van de Vijver <i>et al.</i>, 2002</u>	295	295		0
1.0	PNAS1732912100	<u>Sotiriou <i>et al.</i>, 2003</u>	99	99		0
1.0	GSE1379	<u>Ma <i>et al.</i>, 2004</u>	59	59		0
1.0	GSE2603	<u>Minn <i>et al.</i>, 2005</u>	82	82		82
1.0	GSE1456	<u>Pawitan <i>et al.</i>, 2005</u>	159	159		159
1.0	GSE2034	<u>Wang <i>et al.</i>, 2005</u>	286	286		286
1.0	GSE2741	<u>Weigelt <i>et al.</i>, 2005</u>	50	50		50
1.0	GSE3143	<u>Bild <i>et al.</i>, 2006</u>	158	158		158
1.0	E_TABM_158	<u>Chin <i>et al.</i>, 2006</u>	112	112		112
1.0	GSE4922	<u>Ivshina <i>et al.</i>, 2006</u>	249	249		249
1.0	GSE7390	<u>Desmedt <i>et al.</i>, 2007</u>	198	198		198
1.0	GSE6532	<u>Loi <i>et al.</i>, 2007</u>	267	267		267
1.0	GSE5327	<u>Minn <i>et al.</i>, 2007</u>	58	58		58

1.0	E_UCON_1	<u>Naderi et al., 2007</u>	135	135		135
1.0	GSE7849	<u>Anders et al., 2008</u>	75	75		75
1.0	GSE9893	<u>Chanrion et al., 2008</u>	151	151		0
1.0	GSE9195	<u>Loi et al., 2008</u>	77	77		77
1.0	GSE10510	<u>Calabrò et al., 2009</u>	139	139		139
1.0	GSE11264	<u>Jézéquel et al., 2009</u>	252	0		0
1.1	GSE11121	<u>Schmidt et al., 2008</u>	200	200		200
1.1	GSE12093	<u>Zhang et al., 2009</u>	136	136		136
3.1	GSE8757	<u>Chin et al., 2007</u>	171	171		171
3.1	GSE7378	<u>Zhou et al., 2007</u>	54	54		54
3.1	GSE16391	<u>Desmedt et al., 2009</u>	55	55		55
3.1	GSE22133	<u>Jönsson et al., 2010</u>	346	345		0
3.1	GSE19615	<u>Li et al., 2010</u>	115	115		115
3.1	GSE17907	<u>Sircoulomb et al., 2010</u>	55	55		55
3.1	GSE22219	<u>Buffa et al., 2011</u>	216	216		216
3.1	GSE20711	<u>Dedeurwaerder et al., 2011</u>	85	85		85
3.1	GSE26971	<u>Filipits et al., 2011</u>	277	277		277
3.1	GSE25055	<u>Hatzis et al., 2011</u>	309	309		309
3.1	GSE20685	<u>Kao et al., 2011</u>	296	296		296
3.1	GSE21653	<u>Sabatier et al., 2011</u>	239	239		239
3.1	GSE16987	<u>Wang et al., 2011</u>	149	149		149
3.1	GSE33926	<u>Kuo et al., 2012</u>	51	51		51
3.1	GSE45255	<u>Nagalla et al., 2013</u>	41	41		41
4.3	GSE2109	<u>expO et al., 2005</u>	298	298		298
4.3	GSE8193	<u>Yau et al., 2007</u>	47	47		47
4.3	GSE20462	<u>Parris et al., 2010</u>	94	94		94
4.3	GSE17705	<u>Symmans et al., 2010</u>	43	43		43
4.3	GSE24450	<u>Heikkinen et al., 2011</u>	174	174		174
4.3	GSE31448	<u>Sabatier et al., 2011</u>	71	71		71
4.3	METABRIC	<u>Curtis et al., 2012</u>	1 980	1 980		1 980
4.3	E_MTAB_365	<u>Guedj et al., 2012</u>	536	536		536
4.3	GSE30682	<u>Servant et al., 2012</u>	343	343		343
4.3	GSE42568	<u>Clarke et al., 2013</u>	104	104		104
4.3	GSE40115	<u>Larsen et al., 2013</u>	183	183		183
4.3	GSE55348	<u>Castagnoli et al., 2014</u>	53	53		53
4.3	GSE43358	<u>Fumagalli et al., 2014</u>	56	56		56
4.3	GSE36295	<u>Merdad et al., 2014</u>	45	45		45
4.3	GSE37751	<u>Terunuma et al., 2014</u>	55	55		55
4.3	GSE76274	<u>Burstein et al., 2015</u>	66	66		66
4.3	GSE97177	<u>Biermann et al., 2017</u>	53	53		53
4.6	GSE80999	<u>Aure et al., 2017</u>	381	381		381
4.6	GSE86166	<u>Prabhakaran et al., 2017</u>	366	366		366
Total:			10 644	10 391	49	9 442

2.1.2.1.2 RNA-Seq Veri Setleri

Ver	Study code	Original data		Filtered data		Final data
		Reference	No. patients	Subtyped -selected patients	Gene found	No. patients
4.3	TCGA	TCGA et al., 2012	743	743		743
4.3	SCAN-B / GSE96058	Saal et al., 2015	3 273	3 273		3 273
4.3	SCAN-B / GSE81538	Brueffer et al., 2018	405	405		405
Total:			4 421	4 421	3	4 421

2.1.2.2 Sağ Kalım Analizlerinde Kullanılan Veri Setleri

2.1.2.2.1 DNA Mikroarray Veri Setleri

a) Tam sağkalım (OverallSurvival; OS) analizinde kullanılan DNA Mikroarrayveri setleri:

Ver	Study code	Original data		Filtered data		Final data	
		Reference	No. patients	(N all, ER all, PR all and OS) -selected patients	Gene found	No. patients	No. OS
1.0	Rosetta2002	Van de Vijver et al., 2002	295	295		0	0
1.0	PNAS1732912100	Sotiriou et al., 2003	99	99		0	0
1.0	GSE1379	Ma et al., 2004	59	0		0	0
1.0	GSE2603	Minn et al., 2005	82	0		0	0
1.0	GSE1456	Pawitan et al., 2005	159	159		159	40
1.0	GSE2034	Wang et al., 2005	286	0		0	0
1.0	GSE2741	Weigelt et al., 2005	50	50		50	10
1.0	GSE3143	Bild et al., 2006	158	158		158	50
1.0	E_TABM_158	Chin et al., 2006	112	112		112	35
1.0	GSE4922	Ivshina et al., 2006	249	0		0	0
1.0	GSE7390	Desmedt et al., 2007	198	198		198	56
1.0	GSE6532	Loi et al., 2007	267	0		0	0
1.0	GSE5327	Minn et al., 2007	58	0		0	0
1.0	E_UCON_1	Naderi et al., 2007	135	135		135	47
1.0	GSE7849	Anders et al., 2008	75	0		0	0
1.0	GSE9893	Chanrion et al., 2008	151	151		0	0
1.0	GSE9195	Loi et al., 2008	77	0		0	0
1.0	GSE10510	Calabrò et al., 2009	139	134		134	63
1.0	GSE11264	Jézéquel et al., 2009	252	252		0	0
1.1	GSE11121	Schmidt et al., 2008	200	0		0	0
1.1	GSE12093	Zhang et al., 2009	136	0		0	0
3.1	GSE8757	Chin et al., 2007	171	171		171	57
3.1	GSE7378	Zhou et al., 2007	54	0		0	0
3.1	GSE16391	Desmedt et al., 2009	55	0		0	0

3.1	GSE22133	<u>Jönsson et al., 2010</u>	346	339		0	0
3.1	GSE19615	<u>Li et al., 2010</u>	115	0		0	0
3.1	GSE17907	<u>Sircoulomb et al., 2010</u>	55	0		0	0
3.1	GSE22219	<u>Buffa et al., 2011</u>	216	0		0	0
3.1	GSE20711	<u>Dedeurwaerder et al., 2011</u>	85	0		0	0
3.1	GSE26971	<u>Filipits et al., 2011</u>	277	0		0	0
3.1	GSE25055	<u>Hatzis et al., 2011</u>	309	0		0	0
3.1	GSE20685	<u>Kao et al., 2011</u>	296	296		296	62
3.1	GSE21653	<u>Sabatier et al., 2011</u>	239	0		0	0
3.1	GSE16987	<u>Wang et al., 2011</u>	149	0		0	0
3.1	GSE33926	<u>Kuo et al., 2012</u>	51	0		0	0
3.1	GSE45255	<u>Nagalla et al., 2013</u>	41	41		41	10
4.3	GSE2109	<u>expO et al., 2005</u>	298	0		0	0
4.3	GSE8193	<u>Yau et al., 2007</u>	47	0		0	0
4.3	GSE20462	<u>Parris et al., 2010</u>	94	94		94	44
4.3	GSE17705	<u>Symmans et al., 2010</u>	43	0		0	0
4.3	GSE24450	<u>Heikkinen et al., 2011</u>	174	174		174	27
4.3	GSE31448	<u>Sabatier et al., 2011</u>	71	0		0	0
4.3	METABRIC	<u>Curtis et al., 2012</u>	1 980	1 980		1 980	1 143
4.3	E_MTAB_365	<u>Guedj et al., 2012</u>	536	0		0	0
4.3	GSE30682	<u>Servant et al., 2012</u>	343	0		0	0
4.3	GSE42568	<u>Clarke et al., 2013</u>	104	104		104	35
4.3	GSE40115	<u>Larsen et al., 2013</u>	183	0		0	0
4.3	GSE55348	<u>Castagnoli et al., 2014</u>	53	0		0	0
4.3	GSE43358	<u>Fumagalli et al., 2014</u>	56	55		55	5
4.3	GSE36295	<u>Merdad et al., 2014</u>	45	0		0	0
4.3	GSE37751	<u>Terunuma et al., 2014</u>	55	55		55	19
4.3	GSE76274	<u>Burstein et al., 2015</u>	66	0		0	0
4.3	GSE97177	<u>Biermann et al., 2017</u>	53	0		0	0
4.6	GSE80999	<u>Aure et al., 2017</u>	381	0		0	0
4.6	GSE86166	<u>Prabhakaran et al., 2017</u>	366	366		366	103
Total:			10 644	5 418	49	4 282	1 806

b) Hastaliksız sağkalım (Disease-Free Survival; DFS) analizinde kullanılan DNA Mikroarray veri setleri:

Ver	Study code	Original data		Filtered data		Final data	
		Reference	No. patients	(N all, ER all, PR all and DFS) -selected patients	Gene found	No. patients	No. DFS
1.0	Rosetta2002	<u>Van de Vijver <i>et al.</i>, 2002</u>	295	295		0	0
1.0	PNAS1732912100	<u>Sotiriou <i>et al.</i>, 2003</u>	99	99		0	0
1.0	GSE1379	<u>Ma <i>et al.</i>, 2004</u>	59	59		0	0
1.0	GSE2603	<u>Minn <i>et al.</i>, 2005</u>	82	82		82	27
1.0	GSE1456	<u>Pawitan <i>et al.</i>, 2005</u>	159	159		159	50
1.0	GSE2034	<u>Wang <i>et al.</i>, 2005</u>	286	286		286	107
1.0	GSE2741	<u>Weigelt <i>et al.</i>, 2005</u>	50	50		50	13
1.0	GSE3143	<u>Bild <i>et al.</i>, 2006</u>	158	158		158	50
1.0	E_TABM_158	<u>Chin <i>et al.</i>, 2006</u>	112	112		112	42
1.0	GSE4922	<u>Ivshina <i>et al.</i>, 2006</u>	249	249		249	89
1.0	GSE7390	<u>Desmedt <i>et al.</i>, 2007</u>	198	198		198	91
1.0	GSE6532	<u>Loi <i>et al.</i>, 2007</u>	267	259		259	88
1.0	GSE5327	<u>Minn <i>et al.</i>, 2007</u>	58	58		58	11
1.0	E_UCON_1	<u>Naderi <i>et al.</i>, 2007</u>	135	135		135	65
1.0	GSE7849	<u>Anders <i>et al.</i>, 2008</u>	75	75		75	14
1.0	GSE9893	<u>Chanrion <i>et al.</i>, 2008</u>	151	151		0	0
1.0	GSE9195	<u>Loi <i>et al.</i>, 2008</u>	77	77		77	13
1.0	GSE10510	<u>Calabrò <i>et al.</i>, 2009</u>	139	134		134	96
1.0	GSE11264	<u>Jézéquel <i>et al.</i>, 2009</u>	252	252		0	0
1.1	GSE11121	<u>Schmidt <i>et al.</i>, 2008</u>	200	200		200	46
1.1	GSE12093	<u>Zhang <i>et al.</i>, 2009</u>	136	136		136	20
3.1	GSE8757	<u>Chin <i>et al.</i>, 2007</u>	171	171		171	56
3.1	GSE7378	<u>Zhou <i>et al.</i>, 2007</u>	54	54		54	9
3.1	GSE16391	<u>Desmedt <i>et al.</i>, 2009</u>	55	55		55	55
3.1	GSE22133	<u>Jönsson <i>et al.</i>, 2010</u>	346	339		0	0
3.1	GSE19615	<u>Li <i>et al.</i>, 2010</u>	115	115		115	14
3.1	GSE17907	<u>Sircoulomb <i>et al.</i>, 2010</u>	55	39		39	17
3.1	GSE22219	<u>Buffa <i>et al.</i>, 2011</u>	216	216		216	82
3.1	GSE20711	<u>Dedeurwaerder <i>et al.</i>, 2011</u>	85	85		85	36
3.1	GSE26971	<u>Filipits <i>et al.</i>, 2011</u>	277	258		258	58
3.1	GSE25055	<u>Hatzis <i>et al.</i>, 2011</u>	309	309		309	65
3.1	GSE20685	<u>Kao <i>et al.</i>, 2011</u>	296	296		296	73
3.1	GSE21653	<u>Sabatier <i>et al.</i>, 2011</u>	239	229		229	74
3.1	GSE16987	<u>Wang <i>et al.</i>, 2011</u>	149	147		147	10
3.1	GSE33926	<u>Kuo <i>et al.</i>, 2012</u>	51	51		51	12
3.1	GSE45255	<u>Nagalla <i>et al.</i>, 2013</u>	41	41		41	14
4.3	GSE2109	<u>expO <i>et al.</i>, 2005</u>	298	0		0	0
4.3	GSE8193	<u>Yau <i>et al.</i>, 2007</u>	47	0		0	0
4.3	GSE20462	<u>Parris <i>et al.</i>, 2010</u>	94	94		94	44
4.3	GSE17705	<u>Symmans <i>et al.</i>, 2010</u>	43	43		43	8
4.3	GSE24450	<u>Heikkinen <i>et al.</i>, 2011</u>	174	174		174	34
4.3	GSE31448	<u>Sabatier <i>et al.</i>, 2011</u>	71	0		0	0
4.3	METABRIC	<u>Curtis <i>et al.</i>, 2012</u>	1 980	1 980		1 980	1 235
4.3	E_MTAB_365	<u>Guedj <i>et al.</i>, 2012</u>	536	526		526	118
4.3	GSE30682	<u>Servant <i>et al.</i>, 2012</u>	343	0		0	0
4.3	GSE42568	<u>Clarke <i>et al.</i>, 2013</u>	104	104		104	48
4.3	GSE40115	<u>Larsen <i>et al.</i>, 2013</u>	183	0		0	0
4.3	GSE55348	<u>Castagnoli <i>et al.</i>, 2014</u>	53	53		53	23
4.3	GSE43358	<u>Fumagalli <i>et al.</i>, 2014</u>	56	55		55	10

4.3	GSE36295	<u>Merdad <i>et al.</i>, 2014</u>	45	0		0	0
4.3	GSE37751	<u>Terunuma <i>et al.</i>, 2014</u>	55	55		55	19
4.3	GSE76274	<u>Burstein <i>et al.</i>, 2015</u>	66	0		0	0
4.3	GSE97177	<u>Biermann <i>et al.</i>, 2017</u>	53	0		0	0
4.6	GSE80999	<u>Aure <i>et al.</i>, 2017</u>	381	0		0	0
4.6	GSE86166	<u>Prabhakaran <i>et al.</i>, 2017</u>	366	366		366	119
Total:			10 644	9 079	49	7 884	3 055

c) Uzak metastazsız sağ kalım (Distant Metastasis-Free Survival; DMFS) analizinde kullanılan DNA Mikroarray veri setleri:

Ver	Study code	Original data		Filtered data		Final data	
		Reference	No. patients	(N all, ER all, PR all and DMFS) -selected patients	Gene found	No. patients	No. DMFS
1.0	Rosetta2002	<u>Van de Vijver <i>et al.</i>, 2002</u>	295	295		0	0
1.0	PNAS1732912100	<u>Sotiriou <i>et al.</i>, 2003</u>	99	99		0	0
1.0	GSE1379	<u>Ma <i>et al.</i>, 2004</u>	59	0		0	0
1.0	GSE2603	<u>Minn <i>et al.</i>, 2005</u>	82	82		82	27
1.0	GSE1456	<u>Pawitan <i>et al.</i>, 2005</u>	159	159		159	40
1.0	GSE2034	<u>Wang <i>et al.</i>, 2005</u>	286	286		286	107
1.0	GSE2741	<u>Weigelt <i>et al.</i>, 2005</u>	50	50		50	13
1.0	GSE3143	<u>Bild <i>et al.</i>, 2006</u>	158	0		0	0
1.0	E_TABM_158	<u>Chin <i>et al.</i>, 2006</u>	112	112		112	21
1.0	GSE4922	<u>Ivshina <i>et al.</i>, 2006</u>	249	0		0	0
1.0	GSE7390	<u>Desmedt <i>et al.</i>, 2007</u>	198	198		198	62
1.0	GSE6532	<u>Loi <i>et al.</i>, 2007</u>	267	259		259	66
1.0	GSE5327	<u>Minn <i>et al.</i>, 2007</u>	58	58		58	11
1.0	E_UCON_1	<u>Naderi <i>et al.</i>, 2007</u>	135	0		0	0
1.0	GSE7849	<u>Anders <i>et al.</i>, 2008</u>	75	75		75	14
1.0	GSE9893	<u>Chanrion <i>et al.</i>, 2008</u>	151	151		0	0
1.0	GSE9195	<u>Loi <i>et al.</i>, 2008</u>	77	77		77	10
1.0	GSE10510	<u>Calabrò <i>et al.</i>, 2009</u>	139	0		0	0
1.0	GSE11264	<u>Jézéquel <i>et al.</i>, 2009</u>	252	252		0	0
1.1	GSE11121	<u>Schmidt <i>et al.</i>, 2008</u>	200	200		200	46
1.1	GSE12093	<u>Zhang <i>et al.</i>, 2009</u>	136	136		136	20
3.1	GSE8757	<u>Chin <i>et al.</i>, 2007</u>	171	171		171	38
3.1	GSE7378	<u>Zhou <i>et al.</i>, 2007</u>	54	54		54	9
3.1	GSE16391	<u>Desmedt <i>et al.</i>, 2009</u>	55	0		0	0
3.1	GSE22133	<u>Jönsson <i>et al.</i>, 2010</u>	346	0		0	0
3.1	GSE19615	<u>Li <i>et al.</i>, 2010</u>	115	115		115	14
3.1	GSE17907	<u>Sircoulomb <i>et al.</i>, 2010</u>	55	39		39	17
3.1	GSE22219	<u>Buffa <i>et al.</i>, 2011</u>	216	216		216	82
3.1	GSE20711	<u>Dedeurwaerder <i>et al.</i>, 2011</u>	85	0		0	0
3.1	GSE26971	<u>Filipits <i>et al.</i>, 2011</u>	277	258		258	58
3.1	GSE25055	<u>Hatzis <i>et al.</i>, 2011</u>	309	309		309	65
3.1	GSE20685	<u>Kao <i>et al.</i>, 2011</u>	296	296		296	63
3.1	GSE21653	<u>Sabatier <i>et al.</i>, 2011</u>	239	0		0	0
3.1	GSE16987	<u>Wang <i>et al.</i>, 2011</u>	149	0		0	0
3.1	GSE33926	<u>Kuo <i>et al.</i>, 2012</u>	51	51		51	12
3.1	GSE45255	<u>Nagalla <i>et al.</i>, 2013</u>	41	41		41	14
4.3	GSE2109	<u>expO <i>et al.</i>, 2005</u>	298	0		0	0
4.3	GSE8193	<u>Yau <i>et al.</i>, 2007</u>	47	0		0	0
4.3	GSE20462	<u>Parris <i>et al.</i>, 2010</u>	94	0		0	0

4.3	GSE17705	<u>Symmans et al., 2010</u>	43	43		43	8
4.3	GSE24450	<u>Heikkinen et al., 2011</u>	174	174		174	34
4.3	GSE31448	<u>Sabatier et al., 2011</u>	71	0		0	0
4.3	METABRIC	<u>Curtis et al., 2012</u>	1 980	1 980		1 980	602
4.3	E_MTAB_365	<u>Guedj et al., 2012</u>	536	526		526	118
4.3	GSE30682	<u>Servant et al., 2012</u>	343	0		0	0
4.3	GSE42568	<u>Clarke et al., 2013</u>	104	0		0	0
4.3	GSE40115	<u>Larsen et al., 2013</u>	183	0		0	0
4.3	GSE55348	<u>Castagnoli et al., 2014</u>	53	0		0	0
4.3	GSE43358	<u>Fumagalli et al., 2014</u>	56	55		55	10
4.3	GSE36295	<u>Merdad et al., 2014</u>	45	0		0	0
4.3	GSE37751	<u>Terunuma et al., 2014</u>	55	0		0	0
4.3	GSE76274	<u>Burstein et al., 2015</u>	66	0		0	0
4.3	GSE97177	<u>Biermann et al., 2017</u>	53	0		0	0
4.6	GSE80999	<u>Aure et al., 2017</u>	381	0		0	0
4.6	GSE86166	<u>Prabhakaran et al., 2017</u>	366	0		0	0
Total:			10 644	6 817	49	6 020	1 581

2.1.2.2.2 RNA- Seq Veri Setleri

a) Tam sağkalım (Overall Survival; OS) analizinde kullanılan RNA- Seq veri setleri:

Ver	Study code	Original data		Filtered data		Final data	
		Reference	No. patients	(N all, ER all, PR all and OS) -selected patients	Gene found	No. patients	No. OS
4.3	TCGA	<u>TCGA et al., 2012</u>	743	743		743	95
4.3	SCAN-B / GSE96058	<u>Saal et al., 2015</u>	3 273	3 273		3 273	336
4.3	SCAN-B / GSE81538	<u>Brueffer et al., 2018</u>	405	0		0	0
Total:			4 421	4 016	3	4 016	431

b) Hastalıksız sağkalım (Disease-Free Survival; DFS) analizinde kullanılan RNA- Seq veri setleri:

Ver	Study code	Original data		Filtered data		Final data	
		Reference	No. patients	(N all, ER all, PR all and DFS) -selected patients	Gene found	No. patients	No. DFS
4.3	TCGA	<u>TCGA et al., 2012</u>	743	743		743	131
4.3	SCAN-B / GSE96058	<u>Saal et al., 2015</u>	3 273	3 273		3 273	336
4.3	SCAN-B / GSE81538	<u>Brueffer et al., 2018</u>	405	0		0	0
Total:			4 421	4 016	3	4 016	467

c) Uzak metastazsız sağ kalım (Distant Metastasis-Free Survival; DMFS) analizinde kullanılan RNA- Seq veri setleri:

Ver	Study code	Original data		Filtered data		Final data	
		Reference	No. patients	(N all, ER all, PR all and DMFS) -selected patients	Gene found	No. patients	No. DMFS
4.4	TCGA	<u>TCGA et al., 2012</u>	743	743		743	41
Total:			743	743	1	743	41

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 DNA İzolasyonu

Meme hücre hatlarına ait pelletlerden Thermo Scientific Gene Jet Genomik DNA Saflaştırma Kitinin (#K0721 #K0722), "Memeli Hücre Kültürü Genomik DNA Saflaştırma" protokolü doğrultusunda DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan meme hücre hatlarına ait moleküler alt tip bilgileri (Kao vd. 2009) (ATCC; www.lgcstandards-atcc.org).

Hücre Hattı	Alt Tip	ER	PR	HER2+	Tumoriyenite	Hastalık
BT-20	Bazal-A	-	-	-	Evet	Karsinoma
SK-BR-3	Luminal	-	-	+	Evet	Adenokarsinoma
MDA-MD-231	Bazal-B	-	-	-	Evet	Adenokarsinoma
ZR-75-1	Luminal	+	-	-	Evet	Duktal Karsinoma
MCF 10A	Bazal-B	-	-	-	Hayır	Fibrokistik Hastalık

Hücre pelletlerine 175 µl PBS eklenerek süspanse edildi. Bir sonraki adımda tüplere 200 µl lizis solüsyonu ve 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi. Tüplerin kapakları sıkıca kapatıldı ve birkaç saniye vortekslendi. Ardından tüpler, termal blokta 56 °C 'de 10 dk boyunca inkübe edildi ve her 2 dk 'da bir, birkaç saniye vortekslendi.

Tüplere 20 µl RNase A solüsyonu eklendi ve vortekslenip 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Bir sonraki adım olarak tüplere 400 µl % 50 'lik etanol eklendi ve vortekslendi. Hazırlanan lizat, altında toplama tüpü bulunan kolona aktarıldıktan sonra 6,000x g üzerinde (> 8,000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüj edildi. İçerisinde akış çözeltisi bulunan toplama tüpü diskard edildi ve kolonlara, kitin içerisinde bulunan toplama tüpleri takıldı.

Her bir kolona, Yıkama Tamponu I eklendi ve 8,000 x g üzerinde (> 10,000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne biriken çözelti diskard edildi ve kolona Yıkama Tamponu II eklendi. Ardından kolonlar maksimum hızda (> 12,000 g) 3 dakika santrifüj edildi. Kolonun altında bulunan toplama tüpleri yeniden diskard edildi ve kolonlara yenileri takıldı. Kolonların membranına 150 µl Elüsyon Buffer koyuldu. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi ve 8,000 x g üzerinde (> 10,000 rpm) 1 dakika santrifüjlendi. Bu aşamadan sonra kolonlar atıldı ve toplama tüplerinde bulunan DNA 'lar steril tüplere aktarılıp -20 °C 'ye kaldırıldı. Daha sonra DNA 'ların sağlamlığı ve konsantrasyonları jel elektroforezi ve spektrofotometre yöntemleri ile incelendi.

2.2.2 cDNA Sentezi

RNeasy Mini Kit (Kat. No: 74104) (Qiagen, Almanya) ile hücre hatlarından izole edilmiş olan RNA 'lardan, One Script Plus cDNA Sentez Kiti (Kat. No: G236) (Abm, Canada) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Her bir hücre hattı için yaklaşık 750 ng total RNA alındı (Ek-A1), ardından oligodT, dNTP ve Rnase free su eklendi. Tüpler 65 °C 'de 5 dakika inkübe edildi, devamında 1 dakika buzda bekletildi. 1 saniye kadar kısa bir spin attırma işleminden sonra her bir tüpe sırasıyla 4 µl 5x RT Buffer, 0.5 µl RNaseOFF Ribonuclease Inhibitor ve 1 µl OneScript Plus RTase eklendi.

Her bir tüpe pipetaj işlemi uygulandı ve her tüpe tekrar 1 saniye spin attırıldı. İlgili işlemlerin ardından tüpler EN 500 Nüve inkübatör cihazında 50 °C 'de 50 dakika inkübe edildi. Devamında reaksiyonu sonlandırmak için tüpler 85 °C 'de 5 dakika inkübe edildi. Tüpler birkaç dakika buzda bekletildi ve -20 °C 'ye kaldırıldı.

2.2.3 Bisülfite Modifikasyonu

Bisülfite modifikasyonunda genomik DNA 'nın bisülfite ile modifikasyonu gerçekleştirilir böylece metillenmemiş olan sitozinler kimyasal reaksiyonların sonucunda urasile dönüştürülür. Metillenmiş olan sitozinler ise değişime uğramaz ve yapısını korur. Bu işlemin ardından ilgili DNA, PCR ile amplifiye edilir ve metilasyon durumunu belirlemek için COBRA yöntemi uygulanır (Li ve Tollefsbol 2011; Acun vd. 2017). Bisülfite modifikasyonu, EpiJET Bisülfite Conversion Kit (Thermo Scientific, Kat No: K1461) kullanılarak kitte yazan protokole göre yapılmıştır.

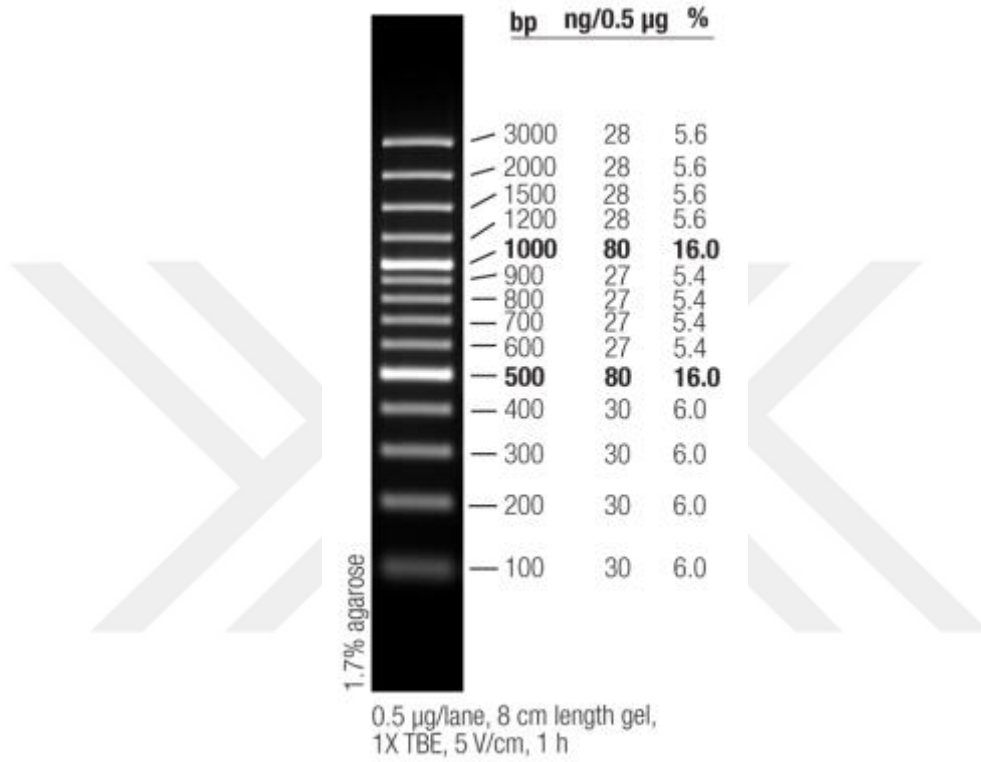
2.2.4 PCR

DNAJC9 genine ait gen ifadesinin incelenmesi için liyofilize olarak satın alınan ve özellikleri Ek A.2 'de belirtilen RT-PCR primerleri, TE buffer kullanılarak 100 µM derişimli stoklar haline getirildi. Hazırlanan primerlerin bir kısmı alikotlandı ve asıl stok saklanmak üzere -20 °C 'ye kaldırıldı. Alikotlanan primerler DNaz ve RNaz içermeyen su ile 100 µM 'dan 10 µM 'a seyreltilti.

Metilasyon analizi çalışması için tasarlanan özellikleri Ek A.3 'te belirtilen Bisülfite PCR primerleri liyofilize olarak satın alındı. TE buffer kullanılarak 100 µM derişimli stoklar haline getirildi. Asıl stok 20 °C 'ye kaldırılmadan önce bir kısmı alikotlandı ve DNaz/RNaz içermeyen su ile 100 µM 'dan 10 µM 'a seyreltilti.

PCR 'ların koşulları Ek A.3 'te de belirtildiği gibi *DNAJC9* geni için 60 °C bağlanma sıcaklığında 35 cycle olarak ayarlanan koşullarda amplifiye işlemi BioRad T-100 cihazı ile gerçekleştirildi. Amplifiye işleminin ardından elde edilen ürünler % 1,5 'luk agaroz jelle yüklendi. Jel hazırlanırken, 1x TAE tamponu kullanıldı. Agaroz hassas terazide (Dikomsan) tartım kağıdı ile tartılıp erlene aktarıldı. Ardından 1x TAE tamponu da eklenip mikrodalga yardımıyla jelin eriyik hale gelmesi sağlandı. Jel soğumadan önce 2 µl etidyum bromür eklenip jelin içinde dağılması sağlandı. Jel, uygun tarağın yerleştirildiği kasete döküldü. Jelin tamamen soğuyarak katı bir form alması beklendi. Jel soğuyup kullanıma hazır hale geldiğinde, içerisinde 1x TAE tamponu bulunan yürütme tankına alındı. Jelde bulunan tarak çıkartılarak, kuyucuklara yükleme yapmaya hazır hale getirildi. Ladder olarak, Şekil 2.1 'de görülen GeneRuler™ DNA Ladder Mix kullanıldı. 5 hücre hattı için de elde edilen 25 µl

hacimli PCR ürünlerinden 5 µl alındı ve 1 µl 6X loading dye (Thermo Scientific, Kat no: R0611) ile beraber pipetaj yapıp, her bir hücre hattı, jelde ayrı birer kuyucuğa mikropipetle yüklendi. Tankın kapağı elektrik yüküne dikkat edilerek, negatiften pozitif olacağı şekilde kapatıldı ve Thermo Scientific güç ünitesi çalıştırılıp 110 voltta 25 dakika yürütüldü. Yürütme işleminin ardından jel alındı ve Vilber Lourmat görüntüleme cihazında analiz edildi.



Şekil 2.1 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

2.2.5 Q-RT-PCR, Semi Kantitatif RT-PCR

DNAJC9 transkriptinin görece kantifikasyonu, üreticinin ilgili talimatlarına göre yapıldı (CF-Rad Laboratories, Inc., CA / ABD) CFX96 Touch™ Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sistemi üzerinde iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Kat. No: 1725120). Referans gen olarak, TBP TATA (box binding protein) geni kullanıldı (Gur-Dedeoglu vd. 2009). Bu çalışma için Ek A.4 'te belirtilen primerler kullanıldı. *DNAJC9* transkriptinin görece seviyeleri, karşılaştırmalı CT metodu ($2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu) ile ölçülmüştür (Livak ve Schmittgen 2001).

Semi kantitatif RT-PCR 'da, meme hücre hatlarındaki *DNAJC9* mRNA ifadesini belirlemek amacıyla Ek A.4 'te belirtilen primerler kullanılarak TBP gen ifadesinin agaroz jeldeki bant yoğunlukları incelendi, akabinde hazırlanan başka bir agaroz jelde hücre hatlarındaki TBP ifadeleri eşitlenecek hacimlerde PCR ürünü yüklendi. Böylece semi kantitatif olarak mRNA ifadesi belirlendi.

2.2.6 Yararlanılan İn-Siliko Araçlar

DNAJC9 genine ait nokta mutasyon ve kopya sayısı varyasyonları kanserde somatik mutasyonlar kataloğu (COSMIC) (v91) veri tabanı ile (Forbes vd. 2017) incelendi.

DNAJC9 geninin promotor bölgesi EPD (Eukaryotic Promoter Database) 'de araştırıldı (Dreos vd. 2014). Promotor bölgesi ile CpG adasının örtüştüğü UCSC genom tarayıcısı ile görüldü (Kent vd. 2002). Primer3 ve MethPrimer programları kullanılarak bisülfid PCR primerleri tasarlandı (Li ve Dahiya 2002). BLAST programı ile bu primer çiftlerinin kontrolü sağlandı.

Meme kanseri hastalarında *DNAJC9* geni mRNA ifadesi ve gen ifadesinin sağ kalıma etkisini görmek için, RNA-seq (TCGA, SCAN-B) ve DNA Microarray (METABRIC, Affymetrix) veri setleri Breast Cancer Gene-ExpressionMiner (bc-GenExMiner v4.8) ile incelenmiştir (Jézéquel vd. 2012).

2.2.7 Mutasyon Analizi

EPD *in-siliko* analiz aracı ile gösterilen ve deneysel olarak doğrulanmış promotör bölgeleri Ek A.3 'te belirtilen primerlerle, doğrudan dizileme yoluyla incelendi. Mutasyon taraması, Mutation Surveyor V5.1.2 (Demo) yazılım paketi (SoftGenetics, LLC., www.softgenetics.com,USA) kullanılarak yapıldı.

2.2.8 Metilasyon Analizi

2.2.8.1 COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)

DNA metilasyonu, gen ekspresyonu üzerinde kalıtsal fakat geri dönüşümlü bir epigenetik kontrol mekanizmasıdır (Bilichak vd. 2017).

Spesifik bölgelerdeki DNA metilasyon seviyelerini belirlemek için kullanılan COBRA yönteminde genomik DNA 'nın bisülfitle modifikasyonunun ardından, DNA 'nın ilgili bölgeye özgü PCR amplifikasyonu yapılır ve DNA metilasyonuna bağlı olarak dizi farklılıklarını ortaya çıkarmak için restriksiyon sindirimi kullanılır. Ardından jel üzerindeki kesim motiflerianaliz edilir (Xiong ve Laird 1997).

DNAJC9 enzim kesiminde, GCG[^]C bölgelerini tanıyan *HhaI* (Kat No: ER1851) restriksiyon enzimi kullanıldı.

2.2.8.2 Metilasyon Analizi İçin Kullanılan *İn-Siliko* Araçlar

DNAJC9 promotor metilasyon verilerini analiz etmek için UALCAN *in-siliko* aracı kullanılmıştır. Kanser Genom Atlas (TCGA) projesiyle birlikte elde edilen çoklu verilerin araştırılması, yeni terapötik/tanısal biyobelirteçlerin ortaya çıkarılması için çeşitli verileri analiz etme amacıyla çevrim içi kullanılan bir araçtır. Bu araç, 31 kanser türünden TCGA seviye üç RNA-seq ve klinik verileri kullanır. Genlerin tümör ve normal numuneler arasında, kanser evreleri, tümör derecesi, ırk, vücut ağırlığı veya diğer klinikopatolojik özelliklere dayalı olarak çeşitli tümör alt gruplarında göreceli ekspresyonunu analiz etmeyi sağlar. Ayrıca gen ekspresyon seviyesinin ve klinikopatolojik özelliklerin hastanın sağkalımı üzerindeki etkisini tahmin etmeye, bireysel kanser türlerinde ilgili genlerin ifade durumunu belirlemeye yardımcı olur (Chandrashekar 2017).



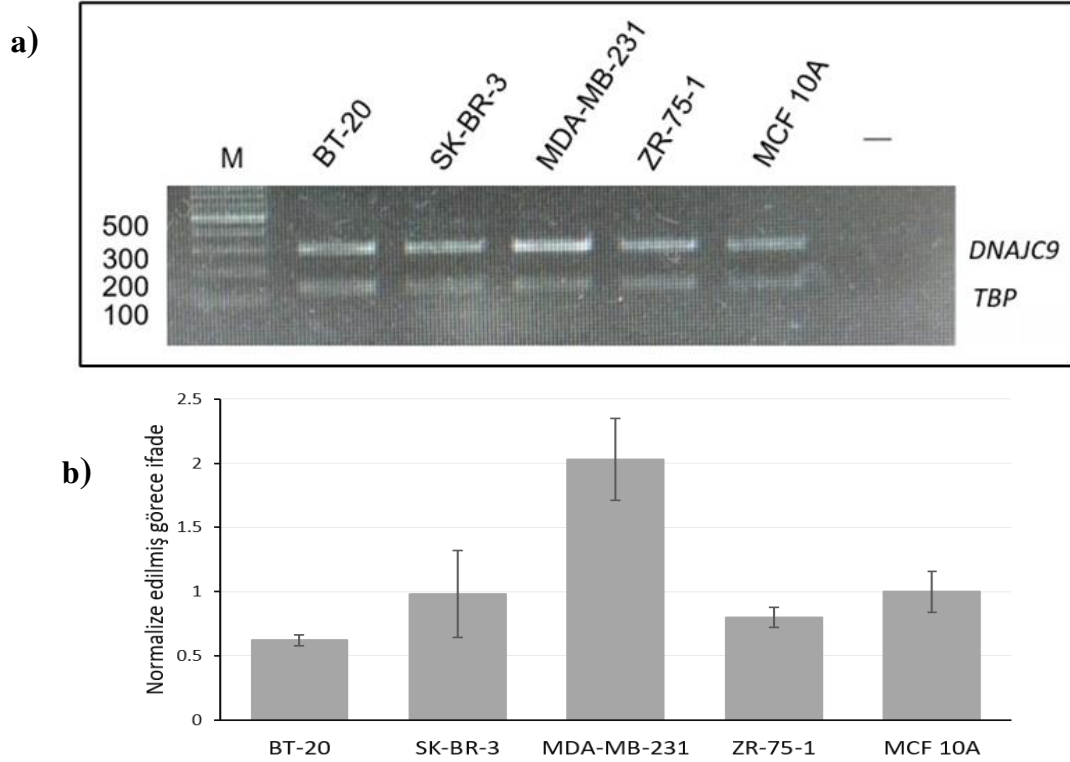
BÖLÜM 3

BULGULAR

3.1 *DNAJC9* GENİNİN MEME KANSERİNDE mRNA İFADE ANALİZİ

3.1.1 Meme Hücre Hatlarında *DNAJC9* Geninin mRNA İfade Analizi

Semi Kantitatif RT-PCR ve Real-time qRT-PCR çalışmasına göre, *DNAJC9* mRNA ifadesi, MDA-MB-231 hücre hattında, MCF10A hücre hattına göre yüksek (> 2 kat) bulunmuştur. Diğer hücre hatlarındaki ifade miktarı MCF10A 'ya kıyasla anlamlı bir fark göstermemiştir (Şekil 3.1).

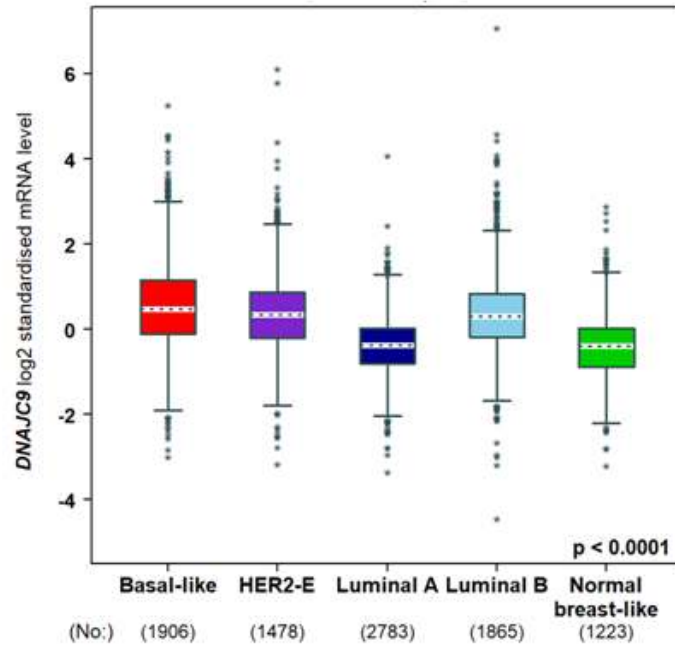


Şekil 3.1 a) Semi Kantitatif RT-PCR çalışması sonucuna göre meme kanseri hücre hatlarında ve tümörijenik olmayan meme epitel hücre hattında (MCF 10A) *DNAJC9* geninin mRNA ifade düzeyi. *TBP* geni için ürün boyu 132 bp, *DNAJC9* geni için ürün boyu 290 bp. (M): DNA Ladder, (-): Negatif Kontrol. b) Real-time qRT-PCR çalışması sonucuna göre meme kanseri hücre hatlarında MCF 10A hücre hattına kıyasla *DNAJC9* mRNA ekspresyonu.

3.1.2 Meme Kanseri Klinik Örneklerinde *DNAJC9* Geninin mRNA İfade Analizi

3.1.2.1 DNA Mikroarray Veri Setlerinde *DNAJC9* Geninin mRNA İfade Analizi

DNA microarray veri setleri Bc-GenExMiner (v4.8) *in-siliko* aracı ile incelenmiştir. *DNAJC9* mRNA ifadesi, basal-benzeri, HER2-E, luminal B meme kanseri alt tiplerinde, normal meme-benzeri örneklerle kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($P < 0.0001$). Luminal A alt tipine ait örnekler ile normal meme-benzeri örneklerin ifadeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P > 0.1$) (Şekil 3.2) (Şekil 3.3).



Şekil 3.2 Meme kanseri alt tiplerindeki *DNAJC9* mRNA ifadesi, DNA mikroarray veri setlerinde bc-GenExMiner (v4.8) *in-siliko* aracı ile incelendi ($n = 9255$).

a) **p(Welch) < 0.0001**

Dunnett-Tukey-Kramer's test:			
gene-expression comparisons			p-value
HER2-E	<	Basal-like	✓ < 0.0001
Luminal A	<	Basal-like	✓ < 0.0001
Luminal A	<	HER2-E	✓ < 0.0001
Luminal B	<	Basal-like	✓ < 0.0001
Luminal B	>	Luminal A	✓ < 0.0001
Normal breast-like	<	Basal-like	✓ < 0.0001
Normal breast-like	<	HER2-E	✓ < 0.0001
Normal breast-like	<	Luminal B	✓ < 0.0001
Luminal B	=	HER2-E	✗ > 0.10
Normal breast-like	=	Luminal A	✗ > 0.10

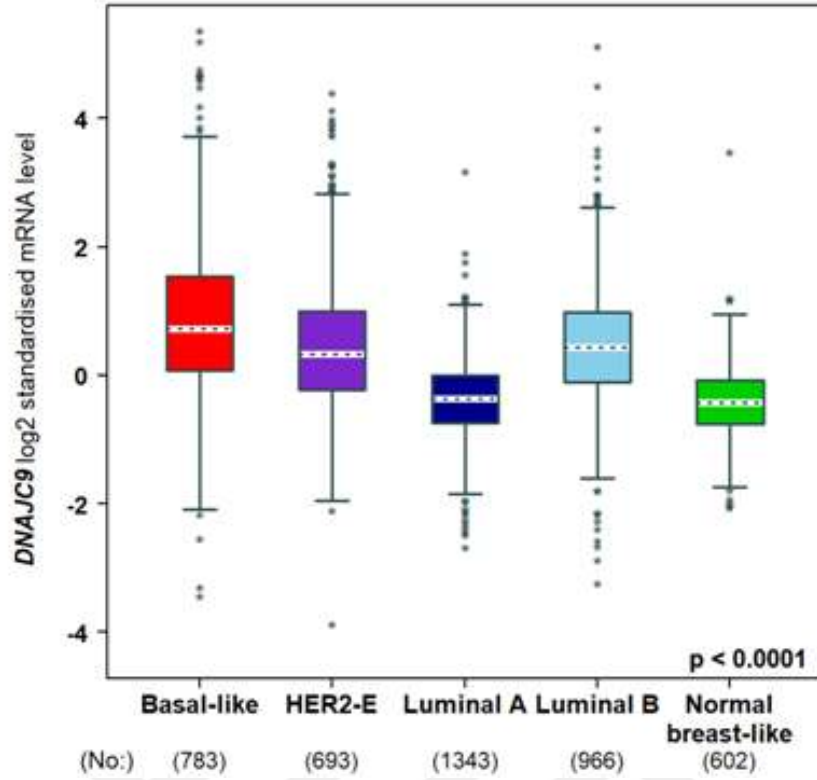
b) **Summary statistics of *DNAJC9* expression by groups**

Groups	Minimum	1 st Q	Median	Mean	3 rd Q	Maximum	SD
Basal-like	-2.9770	-0.1051	0.4663	0.5532	1.1518	5.2716	1.0308
HER2-E	-3.1517	-0.2070	0.3390	0.3600	0.8700	6.1260	0.9037
Luminal A	-3.3403	-0.8029	-0.3695	-0.3766	0.0301	4.0858	0.6317
Luminal B	-4.4344	-0.1830	0.3081	0.3483	0.8324	7.0881	0.8769
Normal breast-like	-3.1922	-0.8755	-0.3881	-0.3988	0.0198	2.9036	0.7063

Şekil 3.3 a) Meme Kanseri Alt Tiplerindeki *DNAJC9* ifadesinin istatistik analizi.
b) Meme kanseri alt tiplerindeki *DNAJC9* ifadelerin dağılımı.

3.1.2.2 RNA- Seq Veri Setlerinde *DNAJC9* Geninin mRNA İfade Analizi

RNA-Seq verilerine göre *DNAJC9* mRNA ifadesi, basal-benzeri, HER2-E, luminal B meme kanseri alt tiplerinde, normal meme-benzeri örneklerle kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($P < 0.0001$). Luminal A alt tipine ait örnekler ile normal meme-benzeri örneklerin ifadeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P > 0.1$) (Şekil 3.4) (Şekil 3.5).



Şekil 3.4 Meme kanseri alt tiplerindeki *DNAJC9* mRNA ifadesi, RNA-seq veri setlerinde bc-GenExMiner (v4.8) *in-siliko* aracı ile incelendi (n = 4387).

a) p(Welch) < 0.0001

Dunnett-Tukey-Kramer's test:

gene-expression comparisons	p-value
HER2-E < Basal-like	✓ < 0.0001
Luminal A < Basal-like	✓ < 0.0001
Luminal A < HER2-E	✓ < 0.0001
Luminal B < Basal-like	✓ < 0.0001
Luminal B > Luminal A	✓ < 0.0001
Normal breast-like < Basal-like	✓ < 0.0001
Normal breast-like < HER2-E	✓ < 0.0001
Normal breast-like < Luminal B	✓ < 0.0001
Luminal B = HER2-E	✗ > 0.10
Normal breast-like = Luminal A	✗ > 0.10

b) Summary statistics of *DNAJC9* expression by groups

Groups	Minimum	1 st Q	Median	Mean	3 rd Q	Maximum	SD
Basal-like	-3.4260	0.0712	0.7315	0.8433	1.5445	5.3796	1.1927
HER2-E	-3.8647	-0.2217	0.3352	0.4312	1.0040	4.4093	1.0338
Luminal A	-2.6715	-0.7440	-0.3620	-0.3690	-0.0026	3.1883	0.5910
Luminal B	-3.2263	-0.1074	0.4318	0.4710	0.9848	5.1256	0.9171
Normal breast-like	-2.0437	-0.7562	-0.4242	-0.4270	-0.0717	3.4802	0.5514

Şekil 3.5 a) Meme Kanseri Alt Tiplerindeki *DNAJC9* ifadesinin istatistik analizi.
b) Meme kanseri alt tiplerindeki *DNAJC9* ifadelerin dağılımı.

3.2 DNAJC9 GENİNİN MEME KANSERİNDEKİ GENETİK ALTERASYONLARI

3.2.1 Meme Hücre Hatlarında DNAJC9 Geninin Promotor Mutasyon Analizi

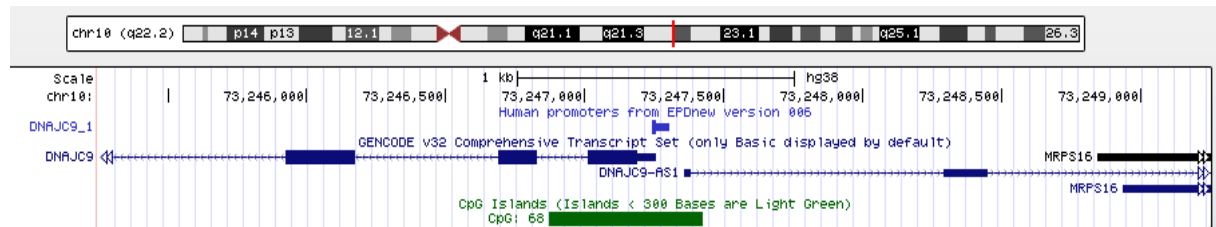
DNAJC9 'un genetik değişiklikleri Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) veri tabanında (v91) araştırıldı. SANGER-COSMIC veri tabanı verilerine göre, DNAJC9 'un meme kanserinde nokta mutasyon ve kopya sayısı değişimi şeklindeki genetik alterasyonların nadir olduğu görüldü (sırasıyla % 0,47 ve % 0,87) (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 DNAJC9 geninin genetik alterasyonları Sanger-COSMIC veritabanında (v95) incelenmiştir (Forbes vd. 2017).

	Mutasyonlu Örnekler/Test Edilen Örnekler (Mutasyonlu Örneklerin Yüzdesi)
Nokta Mutasyonları	12/2750 (% 0,44)
Kopya Sayısı Değişimleri	
Kazanım	13/1492 (% 0,87)
Silinme	3/ 1492 (% 0,2)

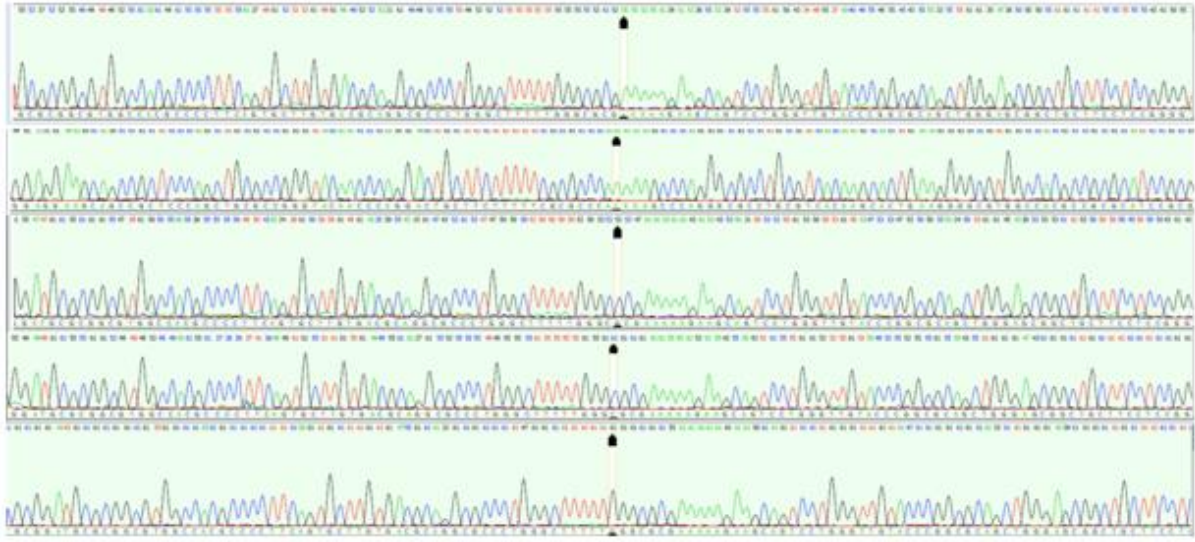
3.2.2 Meme Kanseri Klinik Örneklerinde DNAJC9 Geninin Mutasyon Analizi

DNAJC9 geninin 5' bölgesi, UCSC genom tarayıcısı (<https://genome-euro.ucsc.edu/index.html>) (Dreos vd. 2014; Kent vd. 2002) ve EPD veri tabanı (<https://epd.epfl.ch//index.php>) (Périer vd. 2020) incelendiğinde; DNAJC9_1 olarak belirtilen DNAJC9 'un promotör bölgesinin, bir CpG adası ile örtüştüğü görülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 UCSC genom tarayıcısından alınan görselde DNAJC9 geninin promotor bölgesi (DNAJC9_1), CpG adası ile örtüşmektedir (Dreos vd. 2014; Kent vd. 2002).

Mutation Surveyor V5.1.2 (Demo) yazılım paketi (SoftGenetics, LLC., www.softgenetics.com, USA) kullanılarak gerçekleştirilen mutasyon taramasıyla *DNAJC9* geninin promotör bölgesi meme hücre hatlarında analiz edildi. BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1 ve MCF 10A hücre hatlarına ait promotör bölgelerinde mutasyona rastlanmamıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Sırasıyla, BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1 ve MCF 10A hücre hatlarına ait, *DNAJC9* promotor bölgesini de gösteren dizileme sonuç görselleri. Görseller, “DNA Sequence Assembler” programı ile alınmıştır (<http://www.dnabaser.com/>).

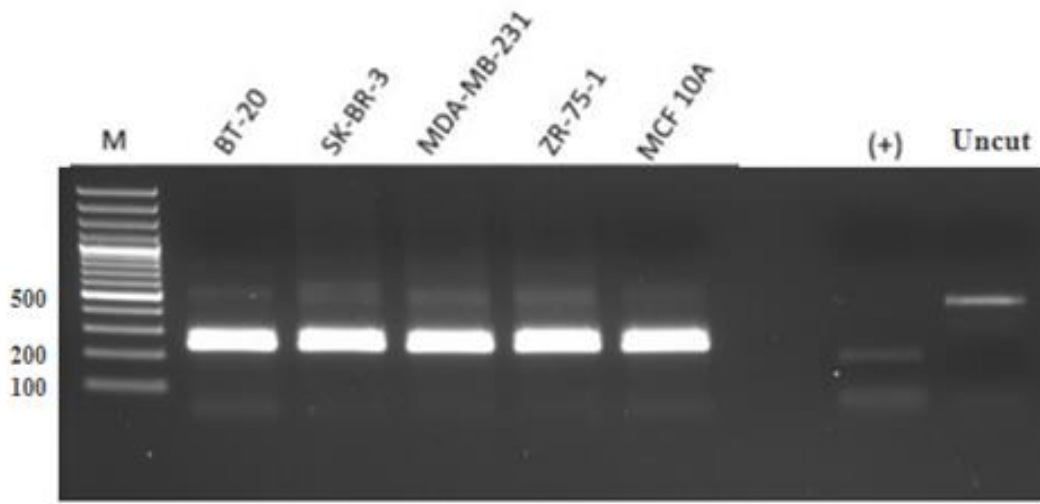
3.3 *DNAJC9* GENİNİN MEME KANSERİNDE PROMOTOR METİLYASYON ANALİZİ

3.3.1 Meme Hücre Hatlarında *DNAJC9* Geninin Promotor Metilasyon Analizi

DNAJC9 geninin promotör bölgesinde CpG adası bulunduğu Şekil 3.6 'da görülmektedir. Bu CpG adasının ilgili meme hücre hatlarındaki metilasyon durumu COBRA yöntemiyle araştırıldı.

COBRA deneyinde bisülfite ile işlem görmüş meme hücre hatlarına ait DNA 'lardaki hedef promotör bölgesi bisülfite PCR yöntemi ile çoğaltıldı. PCR 'lar, koşulları Ek B.1 'de verilen koşullara göre BIO-RAD T100 cihazında yapıldı. Örnekler, % 1,5 agaroz içeren jel elektroforezinde yürütüldü.

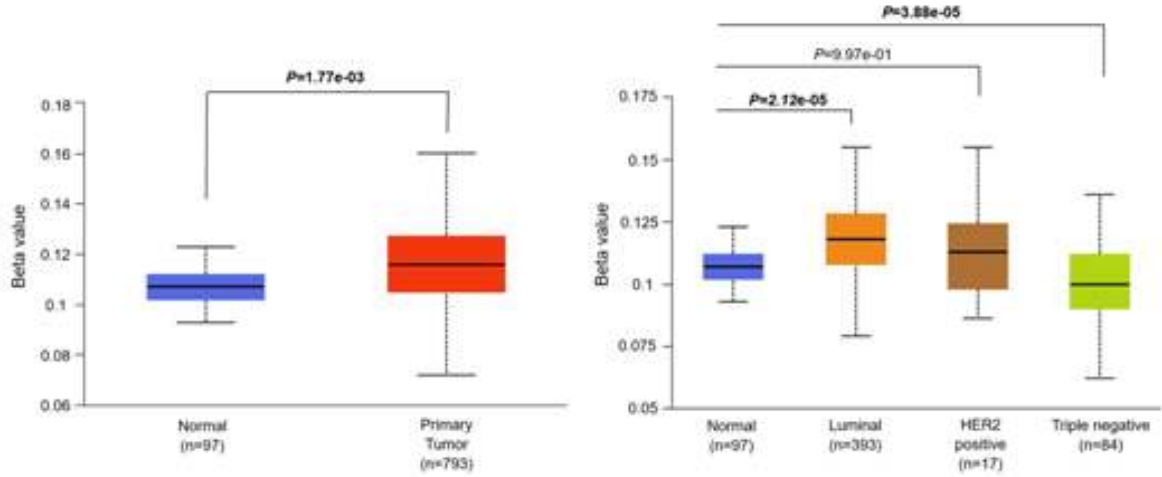
Modifikasyonla DNA 'da bulunan metillenmemiş olan tüm sitozinler bisülfid modifikasyonu ile urasile dönüşür, metillenmiş olan sitozinler ise reaksiyon süresince değişikliğe uğramadan kalır. Gerçekleşen kimyasal reaksiyonun ardından DNA PCR yolu ile amplifiye edildi ve COBRA ile metilasyon durumu belirlendi. *DNAJC9* enzim kesiminde, GCG[^]C bölgelerini tanıyan *HhaI* (Kat No: ER1851) restriksiyon enzimi kullanıldı. Şekil 3.8 'deki COBRA analizi *DNAJC9* promotor bölgesindeki CpG adasının meme hücre hatlarında hipometile olduğunu göstermiştir. *DNAJC9* promotör bölgesinin PCR ampikonu (247 bp) için sindirim ürünlerini (84, 8, 57, 97 bp) göstermiştir.



Şekil 3.8 *DNAJC9* COBRA sonucu. Metile olmuş PCR ampikonunun (247 bp). sindirim ürünleri 84, 8, 57, 97 bp olacaktır. M: DNA Ladder; (+): Pozitif Kontrol, 456 bp 'lık bir PCR ampikonudur ve *HhaI* enzimi ile beklenen sindirim fragmanları 188 bp ve diğer küçük (< 75bp) fragmanlardır. Uncut: Pozitif kontrol olarak kullanılan PCR ampikonuna restriksiyon sindirimi uygulanmadı.

3.3.2 Meme Kanseri Klinik Örneklerinde *DNAJC9* Geninin Promotor Metilasyon Analizi

Buttacavoli ve arkadaşlarının 2021 yılında yayımlanan makalesinde de gösterdiği gibi UALCAN çevrimiçi aracı ile yapılan analizlere göre *DNAJC9* geninin promotor bölgesi, hem normal (n = 97) hem de meme kanseri örneklerinde (n = 793) hipometiledir (beta değeri < 0.25) (Buttacavoli vd. 2021; Chandrashekar vd. 2017). Benzer durum meme kanseri alt tiplerinde de gösterilmiştir (Şekil 3.9).

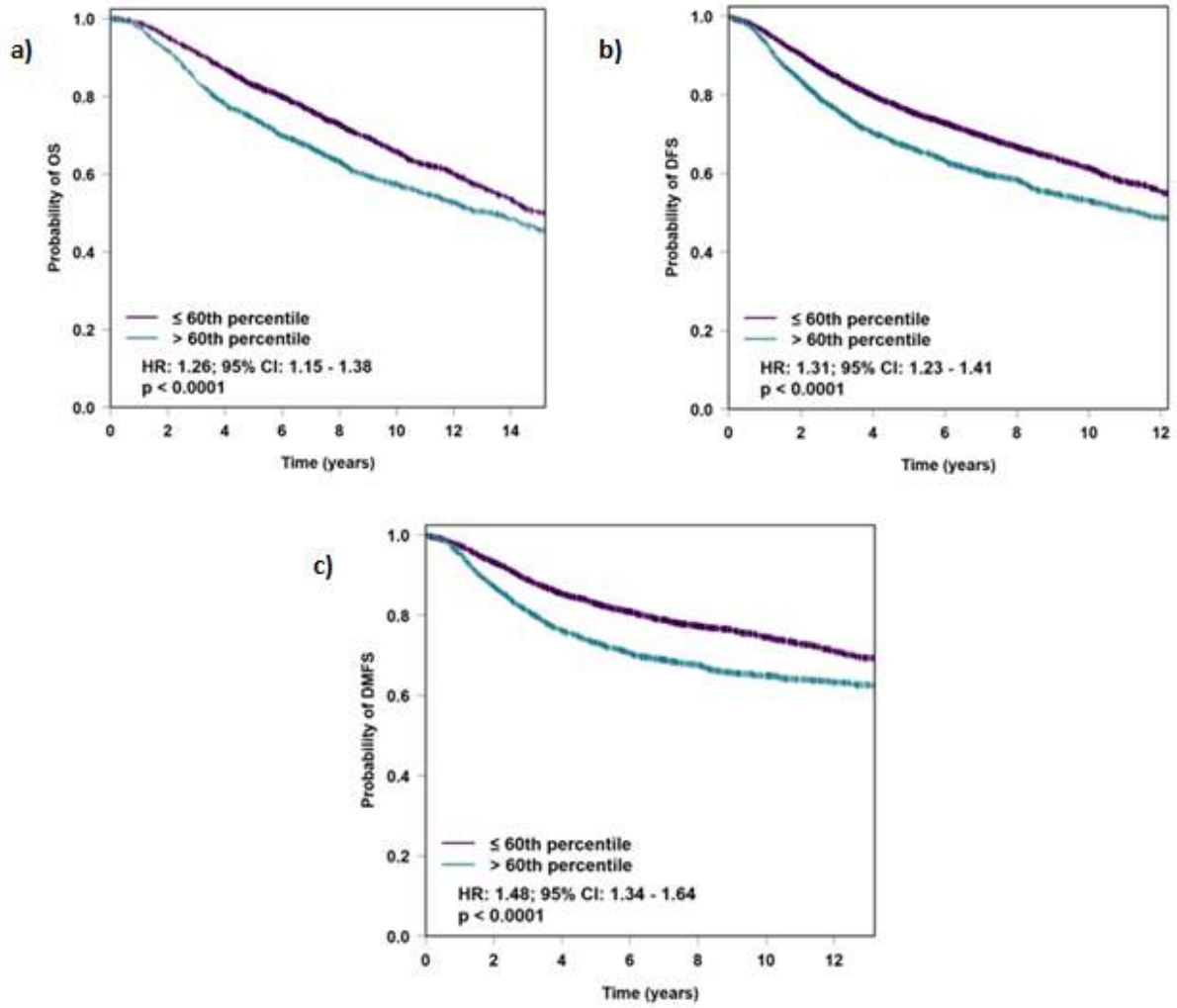


Şekil 3.9 *DNAJC9* promotor bölgesi meme kanseri klinik örneklerinde ve alt tiplerinde hipometiledir. UALCAN çevrimiçi aracı ekran görüntüsü kullanılmıştır (Chandrashekar vd. 2017). İstatiksel olarak anlamlı olan P değerleri koyu renkle gösterilmiştir.

3.4 *DNAJC9* GENİNİN mRNA İFADESİNİN MEME KANSERİ SAĞ KALIM DEĞERLERİNE ETKİSİ

3.4.1 DNA Mikroarray Veri Setlerinde Sağ Kalım Değerleri

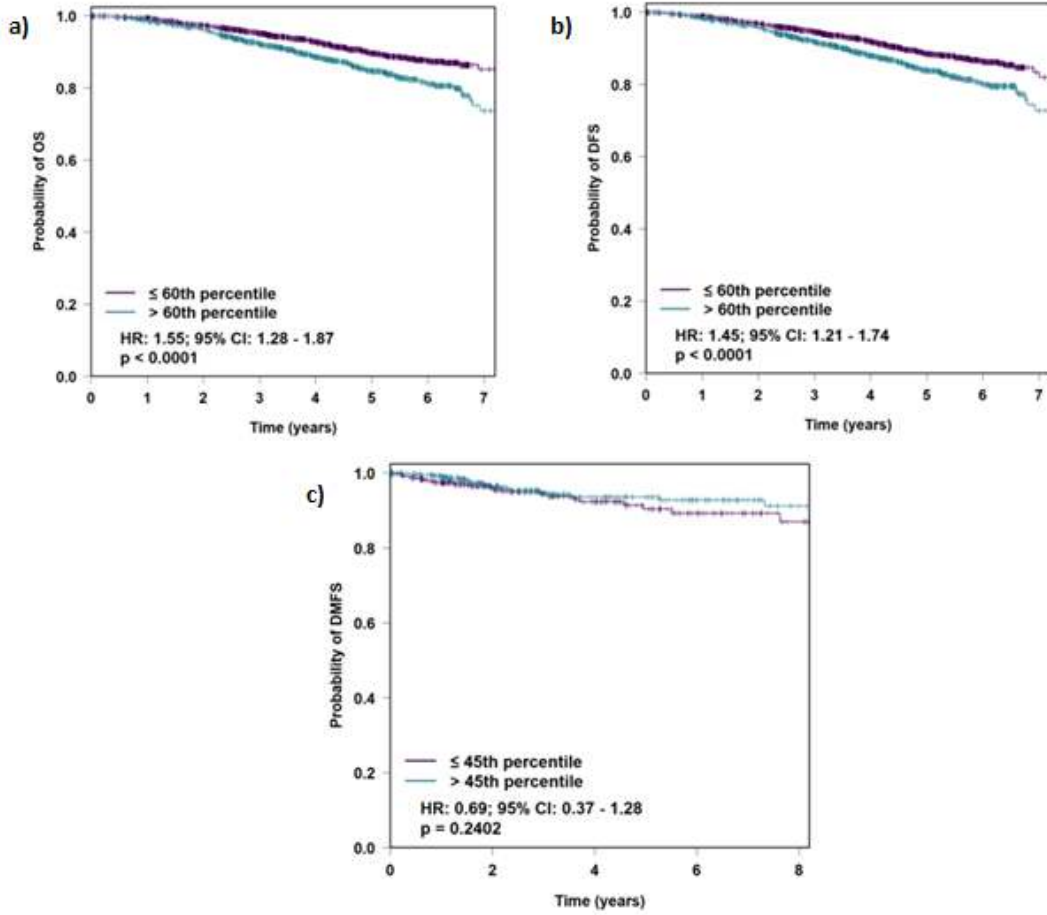
Meme kanserinde *DNAJC9* mRNA ifadesinin DNA mikroarray veri setlerinde sağkalım değerleri incelendiğinde; *DNAJC9* mRNA ifadesi yüksek olan meme kanseri hastalarında tam sağ kalım (OS) (n = 4282), hastalıksız sağkalım (DFS) (n = 7884), uzak metastazsız sağ kalım (DMFS) (n = 6020) oranları anlamlı olarak düşüktür ($P < 0.0001$) (Şekil 3.10) (bc-GenExMiner v4.8).



Şekil 3.10 Meme kanseri hastalarında DNA mikroarray verilerinde *DNAJC9* mRNA ifadesinin prognostik sağkalım değerleri. a) OS (n = 4282) b) DFS (n = 7884) c) DMFS (n = 6020) Bc-GenExMiner (v4.8) aracı kullanılmıştır.

3.4.2 RNA-Seq Veri Setlerinde Sağ Kalım Değerleri

Meme kanserinde *DNAJC9* mRNA ifadesinin RNA-Seq veri setlerinde sağkalım değerleri incelendiğinde; *DNAJC9* mRNA ifadesi yüksek olan meme kanseri hastalarında tam sağ kalım (OS) (n = 4016), hastalıksız sağkalım (DFS) (n = 4016) oranları anlamlı olarak düşüktür ($P < 0.0001$). Uzak metastazsız sağ kalım (DMFS) (n = 743) için anlamlı bir sonuç bulunmamıştır ($P = 0.24$) (Şekil 3.11) (bc-GenExMiner v4.8).



Şekil 3.11 Meme kanseri hastalarında RNA-Seq verilerinde *DNAJC9* mRNA ifadesinin sağkalım değerleri. a) OS (n = 4016) b) DFS (n = 4016) c) DMFS (n = 743) Bc-GenExMiner (v4.8) aracı kullanılmıştır.

3.4.3 *DNAJC9* Geninin mRNA İfadesinin Meme Kanseri Alt Tiplerinde Sağ Kalım Değerlerine Etkisi

Çizelge 3.2 Meme kanseri PAM50 alt tiplerinin Kaplan-Meier sağkalım analizleri. Bc-GenExMiner (v4.8) *in-siliko* aracı kullanıldı.

	Overall Survival		Disease-Free Survival		Distant Metastasis-Free Survival	
	RNA-seq	DNA Microarray	RNA-seq	DNA Microarray	RNA-seq (TCGA)	DNA Microarray
Basal-like	N.S. P = 0.3252 HR = 1.21 n = 712	Unfavorable P = 0.0128 HR = 1.37 n = 838	N.S. P = 0.2546 HR = 1.24 n = 712	Unfavorable P = 0.0071 HR = 1.27 n = 1608	Favorable P = 0.0236 HR = 0.22 n = 136	Unfavorable P = 0.0172 HR = 1.34 n = 1202
Luminal A	Favorable P = 0.0177 HR = 0.58 n = 1205	Favorable P = 0.0283 HR = 0.81 n = 1220	Favorable P = 0.0049 HR = 0.55 n = 1205	N.S. P = 0.1934 HR = 1.13 n = 2283	N.S. P = 0.2233 HR = 2.44 n = 268	N.S. P = 0.2333 HR = 1.19 n = 1734
Luminal B	N.S. P = 0.0762 HR = 0.66 n = 891	N.S. P = 0.3550 HR = 0.88 n = 832	Favorable P = 0.0330 HR = 0.63 n = 891	N.S. P = 0.1857 HR = 1.12 n = 1566	N.S. P = 0.0839 HR = 0.42 n = 281	N.S. P = 0.0773 HR = 1.22 n = 1186
HER2 Positive	N.S. P = 0.1106 HR = 1.46 n = 619	N.S. P = 0.1206 HR = 1.20 n = 712	N.S. P = 0.2346 HR = 1.28 n = 619	N.S. P = 0.1243 HR = 1.15 n = 1256	N.S. P = 0.6336 HR = 1.79 n = 51	N.S. P = 0.3745 HR = 1.11 n = 907
Normal-like	Favorable P = 0.0004 HR = 0.29 n = 558	N.S. P = 0.0928 HR = 0.75 n = 549	Favorable P = 0.0040 HR = 0.38 n = 558	N.S. P = 0.1050 HR = 1.23 n = 1020	CSD n = 5	N.S. P = 0.2179 HR = 0.80 n = 784

CSD: Completely separated data

HR: Hazard ratio

N.S.: Not Significant

Favorable: Yüksek *DNAJA4* ifadesi yüksek sağ kalım olasılığı ile ilişkilidir.

Unfavorable: Yüksek *DNAJA4* ifadesi düşük sağ kalım olasılığı ile ilişkilidir.



BÖLÜM 4

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları *DNAJC9* geni ile ilgili meme kanserinde daha önce gösterilen bulgularla örtüştüğü gibi yeni ve daha kuvvetli veriler de ortaya koymuştur. Önceki çalışmalarda *DNAJC9* ifadesi metastatik serviks kanserlerinde, metastatik olmayanlara göre daha yüksek görülmüştür (Lyng vd. 2006) ve meme kanseri kök hücrelerinde *DNAJC9* geninin ifadesi yüksek bulunmuştur (D. Van Hoof vd. 2006). Ayrıca *DNAJC9* geninin meme kanseri örneklerinde ve bazı meme kanseri alt tiplerinde (basal, HER2+ ve luminal B) normallere göre daha fazla ifade olduğu gösterilmiştir (Zoppino vd. 2018, Buttacavoli vd. 2021). *DNAJC9* gen ifadesinin hasta sağ kalım değerlerine etkisi de KM plotter *in-siliko* aracı ile daha önceki çalışmalarda incelenmiş ve sağkalım değerlerinin gen ifadesi ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (Klimczak vd. 2019; Buttacavoli vd. 2021). KM plotter aracı, Gene Expression Omnibus (GEO) and Array Express 'den aldığı gen ifade ve sağ kalım değerlerini kullanarak plot oluşturan bir programdır. Bu çalışmada adı geçen veri tabanları ile sınırlı kalınmayıp, RNA-Seq ve DNA mikroarray veri setlerinden alınan bilgiler BC-GenExminer (v4.8) aracı ile incelenmiş, böylece hem çok daha yüksek sayıda hastaya ait bilgi işlenmiş hem iki ayrı veri tipi (RNA-Seq, DNA mikroarray) kullanılarak sonuçlar doğrulanmış, hem de meme kanserinin alt tipleri sağ kalım analizine dahil edilmiştir.

DNAJC9 geninin genetik alterasyonlarının ve/veya promotor metilasyonunun ifade üzerindeki etkilerini in-vitro olarak yorumlayabilmek adına farklı alt tiplerini temsil eden meme hücre hatlarını kullandık. *DNAJC9* geninin promotor bölgesindeki olası mutasyonları dizileme yöntemi ile meme hücre hatlarında inceledik ancak herhangi bir mutasyona rastlamadık (Şekil 3.8). *DNAJC9* mutasyonları klinik örneklerde ise çok nadirdir (< %1). Ancak, Sanger-COSMIC veri tabanında, klinik örneklerde, *DNAJC9* 'un promotor veya regülör bölgelere ait mutasyon durumu verilmemektedir ve bunu araştırmaya ayrıca ihtiyaç vardır. *DNAJC9* geninde rastlanan az sayıda mutasyonun lokasyonlarına baktığımızda, HSP70 'in aktivitesinde

çok önemli rol oynayan “J bölgesi” de dahil herhangi bir bölgeye yönelik “hot-spot” mutasyon gözlenmemiştir.

Bilindiği üzere promotor hipometilasyonu ve promotor hipermetilasyonu sırasıyla onkogen aktivasyonu ve tümöt baskılayıcı genlerin aktivasyonuna sebep olabilen epigenetik değişimlerdir (Skvortsova vd. 2019). UCSC genom tarayıcısı (Dreos vd. 2014) ve EPD veri tabanı (Kent vd. 2002) kullanılarak *DNAJC9* geninin promotor bölgesinin CpG adası ile çakıştığı görüldüğünden (Şekil 3.6) bu CpG adasının meme hücre hatlarındaki metilasyon durumu COBRA yöntemiyle incelendi ve promotor bölgesinin meme kanseri ve normal hücre hatlarında hipometile olduğu gözlemlendi (Şekil 3.8). Bu sonuç UALCAN (Chandrashekar vd. 2017) çevrim içi aracı ile meme kanseri klinik örneklerinde de desteklendi (Şekil 3.9). Hipometilasyonun hem normal hem kanser örneklerinde gözlenmesi *DNAJC9* gen ifadesinin, promotor metilasyonundan başka epigenetik mekanizmalar tarafından örneğin lncRNA 'lar (Rinn J ve Chang 2012) veya miRNA 'lar (Davalos vd. 2012) tarafından düzenlenebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle *DNAJC9-AS1* (*DNAJC9* and *MRPS16* antisense RNA 1) isimli antisense RNA 'nın ifade ve regülatör rol analizi yapılmalıdır (Cui ve Cui 2010). Histon modifikasyonları da gen ifadesini etkileyebileceği için (Esteller 2007), *DNAJC9* gen ifadesini etkileyebilecek histon modifikasyonları, yukarıda sayılan diğer epigenetik etmenler ile birlikte araştırılmalıdır.

DNAJC9 geninin genetik alterasyonlarının ve/veya promotor metilasyonunun ifade üzerindeki etkilerini in-vivo 'da da yapabilmek için klinik örnekleri kullandık. Fakat mutasyon analizi, promotor metilasyonu ve gen ifade analizi için kullandığımız klinik örnek grupları tam olarak örtüşmemektedir. Yine de Buttacavoli ve arkadaşlarının UALCAN *in-siliko* aracı ile TCGA kohortunda yaptıkları analiz sonucu ile (Buttacavoli vd. 2021) bu çalışmada aynı kohort ve aracı kullanarak gösterdiğimiz metilasyon analizine baktığımızda, promotor hipometilasyonunun gen ifadesine etkisi olacağını düşünmüyoruz. Bu kanaatimiz, hücre hatlarındaki sonuçlar ile de desteklenmiştir.

DNAJC9 genine ait mRNA ifadesinin araştırılması için kullanılması planlanan UALCAN çevrim içi aracı ve sağ kalım analizlerini incelemek için kullanılması planlanan KM plotter çevrim içi aracı, bu çalışma sürerken ve tez yazım aşamasındayken farklı çalışmalarda kullanılmış olduğundan (Klimczak vd. 2019; Buttacavoli vd. 2021) *DNAJC9* genine ait mRNA ifadesinin meme kanseri alt tiplerini de kapsayacak şekilde araştırılması için Bc-

GenExMiner (v4.8) *in-siliko* aracını kullandık. Çok daha büyük hasta grupları ile elde ettiğimiz veriler, Zoppino vd. ve Buttacavoli vd. çalışmalarını (Zoppino vd. 2018, Buttacavoli vd. 2021) destekler niteliktedir. *DNAJC9* mRNA ifadesi, basal-benzeri, HER2-E, luminal B meme kanseri alt tiplerinde, normal meme-benzeri örneklerle kıyasla anlamlı olarak daha yüksektir ($P < 0.0001$) (Şekil 3.2). Semi kantitatif RT-PCR ve Q-RT-PCR sonuçlarımıza göre, basal-benzeri alt tipi temsil eden MDA-MB-231 hücre hattının ifadesi, normal hücre hattına göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ve bu sonuç klinik örneklerle ait sonuçlarımızı da desteklemektedir. Ancak, diğer hücre hatlarında, mesela HER2-E alt tipini temsil eden SK-BR-3 hücre hattında, klinik örneklerde gördüğümüz anlamlı ifade farkı görülmemiştir. *DNAJC9* genini, normal hücre hattına göre az ve çok ifade eden hücre hatlarını kullanarak tasarlanacak fonksiyonel çalışmalar yardımıyla *DNAJC9* gen ifadesinin hücre morfolojisine ve motilitesine olan etkisi araştırılabilir.

Meme kanseri hastalarında *DNAJC9* mRNA ifadesi tam sağkalım (OS), hastalıksız sağkalım (DFS) ve uzak metastazsız sağkalım (DMFS) değerlerini olumsuz etkilemektedir (Şekil 3.10). Bu bulgularımızda daha düşük sayıda TCGA örneğini analiz eden Klimczak vd. ve Buttacavoli vd. çalışmalarını destekler niteliktedir (Klimczak vd. 2019, Buttacavoli vd. 2021). Ayrıca meme kanseri alt tiplerinde OS, DFS, DMFS değerleri bu çalışma ile ilk kez gösterilmiştir (Çizelge 3.2).

Sonuç olarak, *DNAJC9* geninin mRNA ifadesinin, meme kanseri sağkalımı için iyi bir biyobelirteç adayı olduğunu düşünüyoruz. Ancak *DNAJC9* geninin meme karsinogenezindeki önemini ve nasıl regüle edildiğini daha iyi anlayabilmek için fonksiyonel çalışmalar gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Acun T, Oztas E, Yagci T and Yakicier M C** (2011) SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation. *BMC Cancer*, 6;11:223.
- Acun T, Demir K, Oztas E, Arango D and Yakicier M C** (2015) PTPRD is homozygously deleted and epigenetically downregulated in human hepatocellular carcinomas. *OMICS*, 19(4):220-9.
- Acun T, Doberstein N, Habermann J K, Gemoll T, Thorns C, Oztas E and Ried T** (2017) HLJ1 (DNAJB4) Gene Is a Novel Biomarker Candidate in Breast Cancer. *OMICS*, 21(5):257-265
- Akram M, Iqbal M, Daniyal M and Khan A U** (2017) Awareness and Current Knowledge of Breast Cancer. *Biol Res*. 2;50(1):33
- Albakova Z and Mangasarova Y** (2021) The HSP Immune Network in Cancer. *Front Immunol*. 30;12:796493
- Bini L, Magi B, Marzocchi B, Arcuri F, Tripodi S, Cintorino M, Sanchez J C, Frutiger S, Hughes G, Pallini V, Hochstrasser D F and Tosi P** (1997) Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis*. 18(15):2832-41
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, Torre L A and Jemal A** (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 68(6):394-424
- Buttacavoli M, Cara G D, D'Amico C, Geraci F, Pucci-Minafra I, Feo S and Cancemi P** (2021) Prognostic and Functional Significant of Heat Shock Proteins (HSPs) in Breast Cancer Unveiled by Multi-Omics Approaches. *Biology (Basel)*. 22;10(3):247.
- Calderwood S K and Gong J** (2012) Molecular chaperones in mammary cancer growth and breast tumor therapy. *J Cell Biochem*. 113(4):1096-103
- Chandrashekar D S, Bashel B, Balasubramanya S A H, Creighton C J, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi B V S K and Varambally S** (2017) UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*, 19(8):649-658
- Cui I and Cui H** (2010) Antisense RNAs and epigenetic regulation. *Epigenomics*. 2(1):139-50.
- Cunningham F, Allen J E, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode M R, et al.** (2022) Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res*. 7;50(D1): D988-D995

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Çakmak G D, Emiroğlu S, Sezer A, Canturk N Z, Yeniay L, Kuru B, Karanlık H, Soyder A, Gökgöz Ş, Sakman G, Ucuncu M, Akcay M N, Girgin S, Gurdal S O, Emiroglu M, Ozbas S, Öz A B, Arici C, Toktas O, Demircan O, Çalık A, Polat A K, Maralcan G, Demirer S, Ozmen V** (2020) Surgical Trends in Breast Cancer in Turkey: An Increase in Breast-Conserving Surgery. *JCO Glob Oncol*. 6:285-292
- Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, Esteller M** (2012). Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene*, 31(16), 2062–2074.
- Dreos R, Ambrosini G, Perier R, Bucher P** (2014) The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 43(Database issue): D92-6
- Esteller M** (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews. Genetics*, 8(4):286–298.
- Eustace B K, Jay D G** (2004) Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle*. 3(9):1098-100
- Fagone P, Rosa M D, Palumbo M, Gregorio C D, Nicoletti F, Malaguarnera L** (2012) Modulation of heat shock proteins during macrophage differentiation. *Inflamm Res*. 61(10):1131-9
- Fan C Y, Lee S, Cyr D M** (2003) Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8(4):309-16
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D M, Piñeros M, Znaor A, Bray F** (2019) Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 15;144(8):1941-1953
- Forbes S A, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, Cole C G, Ward S, Dawson E, Ponting L, Stefancsik R, Harsha B, Kok C Y, Jia M, Jubb M, Sondka Z, Thompson S, De T, Campbell P J** (2017) COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Research*, 4;45(D1): D777-D783.
- Fragomeni S M, Sciallis A, Jeruss J S** (2018) Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. (1):95-120
- Genest O, Wickner S, Doyle S M** (2019) Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling. *J Biol Chem*. 8;294(6):2109-2120
- Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z** (2010) An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat.*, 123(3):725-31

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Hoof D V, Passier R, Ward-Van Oostwaard D, Pinkse M W H, Heck A J R, Mummery C L, Krijgsveld J** (2006) A quest for human and mouse embryonic stem cell-specific proteins. *Mol Cell Proteomics*. 5(7):1261-73
- Howlader N, Cronin K A, Kurian A W and Andridge R** (2018) Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 27(6):619-626
- Jesinger R A** (2014) Breast Anatomy for the Interventionalist. *Tech in Vasc Interv Radiol*. 17(1):3-9
- Jézéquel P, Campone M, Gouraud W, Guérin-Charbonnel C, Leux C, Ricolleau G, Campion L** (2012) bc-GenExMiner: an easy-to-use online platform for gene prognostic analyses in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 131(3):765-75
- Khalil A A and James P** (2007) Biomarker Discovery: A Proteomic Approach For Brain Cancer Profiling. *Cancer Science*, 98(2): 201–13.
- Khalil A A, Kabapy N F, Deraz S F, Smith C** (2011) Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1816(2):89-104.
- Kampinga H H, Hageman J, Vos M J, Kubota H, Tanguay R M, Bruford E A, Cheetham M E, Chen B, Hightower L E** (2008) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 14(1):105-11
- Kent W J, Sugnet C W, Furey T S, Roskin K M, Pringle T H, Zahler A M, Haussler D** (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 12(6):996-1006.
- Klimczak M, Biecek P, Zylicz A, Zylicz M** (2019) Heat shock proteins create a signature to predict the clinical outcome in breast cancer. *Sci Rep*. 17;9(1):7507
- Li L C and Dahiya R** (2002) MethPrimer: designing primers for methylation PCRs *Bioinformatics*, 18(11):1427-31
- Li Y, Tollefsbol T O** (2011) DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol.*, 791: 11–21.
- Livak K J, Schmittgen T D** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-8.
- Lyng H, Brøvig R S, Svendsrud D H, Holm R, Kaalhus O, Knutstad K, Oksefjell, Sundfør K, Kristensen G B, Stokke T** (2006) Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC Genomics*. 20;7:268
- Mitra A, Shevde L A, Samant R S** (2009) Multi-faceted role of HSP40 in cancer. *Clin Exp. Metastasis*. 26(6):559-67

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Özmen V, Özmen T and Doğru V** (2019) Breast Cancer in Turkey; An Analysis of 20.000 Patients with Breast Cancer. *Eur J Breast Health.* 1;15(3):141-146
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS** (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* 27 (8):11601167. 10.1200/JCO.2008.18.1370.
- Périer RC, Praz V, Junier T, Bonnard C, Bucher P** (2000) The eukaryotic promoter database (EPD). *Nucleic Acids Res.* 1;28(1):302-3.
- Sims J D, McCready J, Jay D G** (2011) Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90 α assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS One.* 14;6(4): e18848
- Skvortsova K, Stirzaker C, Taberlay P** (2019) The DNA methylation landscape in cancer. *Essays Biochem.* 20;63(6):797-811
- Sterrenberg J N, Blatch G L and Edkins A** (2011) Human DNAI in cancer and stem cells. *Cancer Lett.* 22;312(2):129-42
- Rinn J L and Chang H Y** (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem.*, 81:145-166.
- Varadi M and Tompa P** (2015) The Protein Ensemble Database. *Adv Exp Med Biol.* 870:335-49.
- Vargas-Roig L M, Gago F E, Tello O, Aznar J C and Ciocca D R** (1998) Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer.* 23;79(5):468-75
- Wang C, Zheng W, Yao D, Chen Q, Zhu L, Zhang J, Pan Y, Zhang J, Shao C** (2019) Upregulation of DNA Metabolism-Related Genes Contributes to Radioresistance of Glioblastoma. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 30(2):74-87
- Wu X, Yao D, Su X, Tai B, Huang H, Qiu L, Wu W and Shao Y** (2007) Dynamic expression of rat heat shock protein gp96 and its gene during development of hepatocellular carcinoma *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 6(6): 616-21.
- Xiong Z, Laird P W** (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 15; 25 (12): 2532-4
- Yang Y, Rao R, Shen J, Tang Y, Fiskus W, Nechtman J, Atadja P, Bhalla K** (2008) Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90 α in tumor cell invasion. *Cancer Res.* 15;68(12):4833-42

KAYNAKLAR (devam ediyor)

Zoppino F C M, Guerra-Gimenez M E, Castro G N, Ciocca D R (2018) Comprehensive transcriptomic analysis of heat shock proteins in the molecular subtypes of human breast cancer. BMC Cancer. 28;18(1):700

URL_1<<https://www.hakanbuzoglu.com/memenin-anatomisi-ve-meme-dokusu/>>Ziyaret Tarihi: 04.2022

URL_2_Ensembl:<https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000213551;r=10:73183362-73247255> Ziyaret Tarihi: 03.2022

URL_3_ Breast Cancer Gene-Expression Miner v4.8:< <http://bcgenex.ico.unicancer.fr/BC-GEM/GEM-Accueil.php>> Ziyaret Tarihi: 04.2022

URL_4_ UALCAN:<<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>> Ziyaret Tarihi: 04.2022

URL_5_COSMIC:<<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>> Ziyaret Tarihi: 04.2022

URL_6_EPD Database:< <https://epd.epfl.ch/>> Ziyaret Tarihi: 04.2022

URL_7_UCSC Genome Browser:< <https://genome.ucsc.edu/>> Ziyaret Tarihi: 04.2022

URL_8_Primer3:< <https://primer3.ut.ee/>> Ziyaret Tarihi: 03.2022

URL_9_MethPrimer:< <http://www.urogene.org/methprimer/index.html>> Ziyaret Tarihi: 03.2022

URL_10_BLAST:< <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> Ziyaret Tarihi: 04.2022



EK AÇIKLAMALAR

Ek A: Konsantrasyonlar ve Primer Çiftleri

Çizelge A.1 Genomik DNA ve RNA Konsantrasyonları

DNA'lar	Ölçüm Sonucu	600 nM'a Göre Hesaplama
BT-20	134 ng/μl	4,47 μl
SK-BR-3	158 ng/μl	3,79 μl
MDA-MB-231	120 ng/μl	5 μl
ZR-75-1	122 ng/μl	4,91 μl
MCF 10A	122 ng/μl	4,91 μl

RNA'lar	Ölçüm Sonucu	750 ng'a Göre Hesaplama (cDNA sentezi için)
BT-20	362 ng/μl	2,75 μl
SK-BR-3	365 ng/μl	2,75 μl
MDA-MB-231	881 ng/μl	1,05 μl
ZR-75-1	554 ng/μl	1,92 μl
MCF 10A	198 ng/μl	5,18 μl

Çizelge A.2 *DNAJC9* Bisülfıt Nested Primerleri

Primer Setleri	Sense primer 5'-3'	Antisense primer 5'-3'	Ürün Boyu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı
<i>DNAJC9</i> -Bi-1	TTATTTTTTTGAAGATTTAGTTTTTG	AAAAATCCAACAACCCCATAC	282	54°C
<i>DNAJC9</i> -Bi-2	GGGGATTGTGATTTTATATGT	AAAAATCCAACAACCCCATAC	247	53°C

Çizelge A.3 *DNAJC9* Dizileme Primerleri

Primer Setleri	Sense primer 5'-3'	Antisense primer 5'-3'	Ürün Boyu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı
<i>DNAJC9</i> -Pro	AAAAGGTAAGACGGACGCCA	TCCTCCTTGTCGCCCTCA	481	59°C

Çizelge A.4 *DNAJC9* Q-RT-PCR ve Semi Kantitatif RT-PCR Primerleri

Primer Setleri	Sense primer 5'-3'	Antisense primer 5'-3'	Ürün Boyu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı
<i>DNAJC9</i> -Q-RT-PCR	CTCTCCTGTGCTCACCCAAG	AGCCAGCTCTTCTTCCGAAC	124	60°C
<i>DNAJC9</i> -Semi-Q-RT-PCR	CCGACGAGGCTACCACAAG	CCAGCTCTTCTTCCGAACCT	290	60°C
<i>TBP</i>	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA	132	60°C



Ek B: PCR Koşulları

Çizelge B.1 *DNAJC9* Nested PCR Koşulları

<u>PCR Aşamaları</u>	<u>Bisülfite Nested PCR Koşulları</u>
Başlangıç Denatürasyonu	95°C-2 Dk
Denatürasyon	95°C-30 Sn
Bağlanma*	56°C-30 Sn
Uzama	72°C-30 Sn
Son Uzama	72°C-5 Dk

* Yapılan çalışmada farklı primer setleri kullandığı için bağlanma sıcaklığı 53 °C ve 54 °C olarak düzenlenmiştir.



ÖZGEÇMİŞ

Oya İNCEKARA, İlk, orta ve lise eğitimini Zonguldak'ın Ereğli ilçesinde tamamladı. 2015 yılında Öğrenci Seçme ve Yerleştirme Merkezi tarafından düzenlenen üniversite giriş sınavı sonucunda Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi FenEdebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü kazandı. Dört yıllık lisans eğitiminden sonra 2019 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi'nden mezun oldu ve aynı yıl girdiği ZBEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladı.